



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Química e Ingeniería Química**

**Escuela Académico Profesional de Ingeniería Química**

**Análisis semicuantitativo del contenido de ésteres  
metílicos, de ácidos grasos, para la aplicación en el  
monitoreo del proceso de producción de biodiesel, por  
cromatografía de gases**

**TESIS**

**Para optar el Título Profesional de Químico**

**AUTOR**

**Jorge Luis RODRÍGUEZ CHERO**

**ASESOR**

**Scila REÁTEGUI SÁNCHEZ**

**Lima, Perú**

**2011**



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Rodríguez, J. (2011). *Análisis semicuantitativo del contenido de ésteres metílicos, de ácidos grasos, para la aplicación en el monitoreo del proceso de producción de biodiesel, por cromatografía de gases*. Tesis para optar el título de Químico. Escuela Académico Profesional de Ingeniería Química, Facultad de Química e Ingeniería Química, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

---

**Dedico la presente tesis a mis padres Lucila, Hermilio, mi hermano Luis Daniel,  
mis tías Juanita y María, y a todos mis profesores que con sus enseñanzas hicieron  
de mi una persona profesional y sobre todo, humana.**

## **AGRADECIMIENTOS**

*A la Unidad de Análisis Químicos (USAQ), lugar donde aprendí los conocimientos básicos de instrumentación que, posteriormente, me ayudaron a realizar la presente tesis. A la señorita Quím. Maria Angélica Rodríguez Best, que confió en mi desde el primer momento. A mi profesora Quím. Scila Reátegui Sánchez quien no dudó en asesorar mi tesis y siempre estuvo apoyándome en mi desarrollo profesional. A la empresa Electromédica Peruana S.A. y al Ing. Juan Miyamoto Akagui, por su invaluable apoyo en la presente tesis. Finalmente a la Srta. Nancy Pariona Mendoza. Que siempre estuvo a mi lado apoyándome en la tesis.*

### **Miembros del Jurado**

- **Quim. Juana María Huamán Malla. (Presidente)**
- **Dr. Gloria Alejandrina Cosco Salguero. (Miembro)**
- **Mg. Scila Reátegui Sánchez (Asesor).**

**Fecha de Sustentación 22 de Marzo del 2011**

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.</b>	<b>10</b>
<b>2. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS.</b>	<b>12</b>
<b>2.1. CARACTERÍSTICAS DE LA MATERIA PRIMA Y DEL BIODIESEL.</b>	<b>15</b>
<b>2.2. BIODIESEL: ALTERNATIVA DE COMBUSTIBLE PARA MOTORES         DIESEL.</b>	<b>16</b>
<b>2.3. PROCESOS DE PRODUCCIÓN DEL BIODIESEL.</b>	<b>17</b>
<b>2.4. TRANSESTERIFICACIÓN ALCALINA CON ETANOL.</b>	<b>20</b>
<b>2.5. ANTECEDENTES SOBRE CROMATOGRAFIA DE GASES.</b>	<b>22</b>
<b>2.6. TERMINOLOGIA APLICADA EN CROMATOGRAFIA.</b>	<b>25</b>
<b>2.7. CROMATOGRAFIA DE GASES.</b>	<b>27</b>
<b>2.8. EL CROMATÓGRAFO DE GASES.</b>	<b>30</b>
<b>2.9. FASE MOVIL O GAS DE ARRASTRE.</b>	<b>32</b>
<b>2.10. COLUMNAS CROMATOGRAFICAS.</b>	<b>34</b>
<b>2.11. INYECCION DE MUESTRA.</b>	<b>37</b>
<b>2.12. DETECTORES.</b>	<b>41</b>
<b>2.13. ANALISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO EN CROMATOGRAFIA         DE GASES.</b>	<b>43</b>
<b>2.14. ANALISIS CUALITATIVO.</b>	<b>44</b>
<b>2.15. ANALISIS CUANTITATIVO.</b>	<b>45</b>

2.16.	METODO DE NORMALIZACIÓN DE ÁREAS.	45
2.17.	METODO DE NORMALIZACIÓN DE ÁREAS, CON FACTOR DE RESPUESTA.	46
2.18.	METODO DE ESTÁNDAR EXTERNO.	47
2.19.	METODO DE ESTÁNDAR INTERNO.	48
2.20.	TRATAMIENTO ESTADISTICO DE RESULTADOS.	49
2.21.	POBLACIONES Y MUESTRAS.	51
2.22.	EXACTITUD Y PRECISIÓN.	52
2.23.	MEDIA ARITMETICA.	53
2.24.	DESVIACION ESTANDAR ( $\sigma$ ) Y VARIANZA ( $\sigma^2$ )	53
2.25.	COEFICIENTE DE VARIACION.	54
2.26.	PRUEBA DE HIPOTESIS.	55
2.27.	METODO DE PRUEBAS DE HIPOTESIS.	55
2.28.	FORMULACION DE LAS HIPOTESIS.	55
3.	MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO.	56
3.1.	REACTIVOS.	56
3.2.	MATERIALES.	56
3.3.	CARACTERISTICAS DEL CROMATOGRAFO DE GASES CON DETECTOR FID.	57
3.4.	PUESTA EN OPERACIÓN DEL CROMATOGRAFO.	57
	3.4.1.- Precauciones importantes antes del encendido.	57
	3.4.2.- Encendido del Equipo.	58



<b>4. DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>	<b>61</b>
<b>4.1. PREPARACION DEL MATERIAL VOLUMETRICO.</b>	<b>61</b>
<b>4.2. PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES.</b>	<b>61</b>
<b>4.3. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.</b>	<b>62</b>
<b>4.4. ANALISIS SEMICUANTITATIVO DEL CONTENIDO DE ESTERES METILICOS DE ACIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFIA DE GASES.</b>	<b>62</b>
<b>4.5. VERIFICACION DE LOS RESULTADOS SOBRE CONTENIDO DE ESTERES METILICOS DE ACIDOS GRASOS DE ACUERDO A LA NORMA EN-14103.</b>	<b>64</b>
<b>5. RESULTADOS OBTENIDOS.</b>	<b>66</b>
<b>6. EJEMPLO DE CALCULOS.</b>	<b>109</b>
<b>7. EVALUACIÓN DE RESULTADOS.</b>	<b>113</b>
<b>7.1. EVALUACIÓN ESTADISTICA DE LOS DATOS OBTENIDOS.</b>	<b>113</b>
<b>7.2. EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD.</b>	<b>113</b>
<b>7.2.1.- Verificación de comportamiento normal de residuales.</b>	<b>113</b>
<b>7.2.2.- Verificación del porcentaje de recuperación.</b>	<b>115</b>
<b>7.3. EVALUACIÓN DE LA PRECISIÓN.</b>	<b>116</b>
<b>7.3.1.- Verificación de comportamiento normal de residuales.</b>	<b>116</b>
<b>7.3.2.- Verificación de igualdad de varianzas.</b>	<b>118</b>
<b>7.3.3.- Coeficiente de Variación.</b>	<b>119</b>
<b>7.3.4.- Verificación de la repetibilidad, según la norma EN-14103.</b>	<b>120</b>

<b>8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.</b>	<b>122</b>
<b>9. CONCLUSIONES.</b>	<b>125</b>
<b>10. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>126</b>
<b>11. ANEXOS</b>	<b>131</b>
<b>11.1. CERTIFICADO DE ANALISIS FAME MIX SUPELCO.</b>	<b>131</b>
<b>11.2. CERTIFICADO DE ANALISIS HEPTADECANOATO DE METILO             RESTEK.</b>	<b>133</b>
<b>11.3. MÉTODO REFERENCIAL: EN-14103.</b>	<b>134</b>

## RESUMEN

La calidad de biodiesel tiene relación directa con su contenido de ésteres metílicos de ácido graso. Su cuantificación de acuerdo a la norma EN-14103 se realiza al final del proceso. A diferencia de lo que ésta considera, en el presente trabajo se modifica la forma de su cuantificación; con la finalidad de aplicarla durante las diferentes etapas del proceso de producción de biodiesel, particularmente en el proceso de transesterificación de los aceites. Son tres los aspectos, motivo de modificación:

1. Reemplazo del estándar interno, heptadecanoato de metilo de 10 mg/mL que se añade a cada muestra, por factores de respuesta para cada éster metílico de ácido graso.
2. Los factores de respuesta son calculados a partir de las áreas obtenidas, cuando se inyecta una solución estándar que contiene una mezcla de 37 ésteres metílicos de ácido graso.
3. Los cambios introducidos no alteraron la forma de expresar los resultados finales. Estos se ajustan y son comparables a lo establecido en la norma EN-14103.

En cuanto a la verificación de la exactitud y la precisión, los resultados obtenidos son comparables con aquellos reportados al aplicar la norma internacional EN-14103. Para establecer la precisión de la semicuantificación propuesta, se hicieron 12 repeticiones de la misma muestra y el grado de dispersión de los resultados fue determinado mediante el cálculo del coeficiente de variación (%C.V.) y homogeneidad de varianzas.

## **1. INTRODUCCIÓN.**

La actual demanda de energía y la reducción de las fuentes de combustible fósil; hacen que los recursos de la biomasa se vuelvan mucho más atractivos para la humanidad. Una de las alternativas actuales es el biodiesel, el cual combustiona de la misma manera que el diesel de petróleo; pero que a diferencia de éste emite contaminantes regulables y probablemente sea más eficiente que la gasolina; exhibiendo también un gran potencial para motores de compresión–ignición. Actualmente, el biodiesel es producido a partir de semillas de soya, colza y aceite de palma y, durante el proceso de su obtención, es importante conocer el porcentaje de ésteres metílicos que se forman a partir de sus respectivos ácidos grasos.

La ponderación del contenido de ésteres metílicos de ácido graso, durante el proceso de producción de biodiesel, es un valor importante porque nos permite establecer un parámetro de control de calidad, que estandarizado corresponde a un valor que tiende al 100% y que se identifica como B100. La norma internacional EN-14103 es aplicada para evaluar el contenido de ésteres metílicos de ácidos grasos en B100, obtenido a partir de diferentes fuentes naturales renovables. Sin embargo, el método que aplica esta norma sólo evalúa el producto al final del proceso de producción; razón por la cual se hace necesario desarrollar una metodología de análisis; con la finalidad de monitorear la concentración de ésteres metílicos de ácido graso presentes en el biodiesel, durante las diferentes etapas de su proceso de producción.

El logro de este objetivo fue alcanzado mediante la realización del presente trabajo, al modificar la forma de cuantificar cada éster metílico de ácido graso. El control del contenido de ésteres metílicos de ácidos grasos en B100 durante el proceso de producción se ejecuta en línea, usando factores de respuesta generados a partir de un estándar reportado para una mezcla de ésteres metílicos; provenientes de un ácido graso en particular. Los factores de respuesta, obtenidos, relacionan la masa de un determinado éster con el área proporcionada por el detector del cromatógrafo de gases.

Los resultados obtenidos fueron evaluados mediante la verificación de la exactitud y precisión de la semicuantificación propuesta. Mediante la exactitud, nuestros resultados han sido comparados con los resultados adquiridos mediante la aplicación de la norma internacional EN-14103, en la misma muestra. Para conocer la precisión de la semicuantificación propuesta se hicieron, en total, 12 repeticiones a la misma muestra; de las cuales 6 fueron realizadas por un analista y otras 6, por otro analista. El grado de dispersión de los resultados obtenidos, fue comprobado mediante el uso de herramientas estadísticas; como el coeficiente de variación (%C.V.).

El trabajo experimental fue realizado en un cromatógrafo de gases marca SHIMADZU, modelo GC-2010, usando como Estándar el Heptadecanoato de Metilo (grado cromatográfico), (100 mg) Marca RESTEK y Estándar de Mezcla de ésteres metílicos F.A.M.E. Mix C4-C24 (grado cromatográfico), (100 mg) Marca SUPELCO.

## **2. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS.**

En la actualidad se sabe que la mayor parte de la demanda energética es atendida por fuentes de energía convencionales como el carbón, petróleo y gas natural. Los combustibles basados en petróleo son reservas limitadas y están concentradas sólo en determinadas regiones del mundo; de ahí que la escasez de los combustibles fósiles convencionales, el aumento de emisiones contaminantes y sus costos excesivos hacen que los recursos renovables de la biomasa se vuelvan mucho más atractivos para la humanidad<sup>1</sup>. Al respecto, los expertos sugieren que las reservas de petróleo y las reservas de gas natural serán suficientes sólo para las últimas décadas, frente a lo cual se hace necesario reemplazar las reducidas reservas de petróleo por los biocombustibles, como el biodiesel <sup>(01)</sup>.

El término biocombustible se refiere a combustibles líquidos o gaseosos para el sector transporte y que son producidos, predominantemente, a partir de la biomasa. Su uso incluye razones de seguridad energética, ahorros de divisas y temas socioeconómicos, relacionadas con el sector rural <sup>(02)</sup>.

Sin embargo, es por todos conocido que el transporte es totalmente dependiente del combustible fósil, particularmente, de los combustibles basados en petróleo como la gasolina, diesel, gas licuado de petróleo (GLP) y gas natural (GN) <sup>(03)</sup>.

En países desarrollados el uso de tecnologías modernas y de conversiones eficientes de bioenergía, en base a una variedad de biocombustibles, resulta económico y compiten con los combustibles fósiles <sup>(04)</sup>.

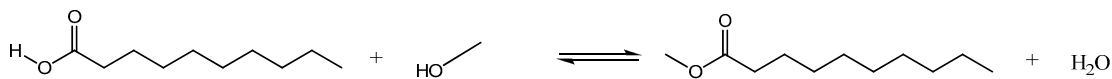
Sin embargo, para cuantificar el efecto del biodiesel es importante tomar en cuenta varios factores; entre ellos: el origen de la materia prima, ciclo de manejo, tecnología del vehículo, etc. <sup>(05)</sup>.

Biodiesel, es el nombre que se da a una variedad de combustibles basados en ésteres de fuentes biológicas renovables; pudiendo ser elaborado a partir de grasas o aceites orgánicos, previamente procesados. Químicamente, el biodiesel es definido como un monoalquiléster de ácidos grasos orgánicos de cadena larga y derivados de biolípidos renovables, que se combustiona igual que el diesel de petróleo y emite contaminantes regulables. Por otro lado, el biodiesel probablemente es más eficiente que la gasolina y exhibe un gran potencial para motores de compresión – ignición <sup>(06)</sup>.

Así mismo, el biodiesel es descrito como de aceites vegetales o grasas animales y El biodiesel puro o al 100% también se le conoce como B100 o combustible “neto”. Una mezcla de biodiesel es aquella que consta de biodiesel puro y petrodiesel. Dichas mezclas de biodiesel están referidas como BXX; donde el XX se usa para indicar el porcentaje de biodiesel presente en la mezcla. Así, una mezcla B80 está formada por 80 % de biodiesel y 20 % de petrodiesel <sup>(07)</sup>.

Producir biodiesel a partir de aceites vegetales no es un proceso nuevo. La conversión de aceites vegetales o grasas animales en monoalquil ésteres, o biodiesel propiamente dicho, es conocida como transesterificación. Duffy y Patrick descubrieron este proceso a inicios del año 1853. Sin embargo, la era del diesel de petróleo se inició en 1893 cuando el famoso inventor alemán Dr. Rudolph Diesel realizó una publicación titulada: *“La teoría y construcción de la máquina de calor racional”*. La publicación describe una maquina revolucionaria en la cual el aire debe ser comprimido por un

pistón a una elevada presión, causando un incremento de la temperatura. El Dr. Diesel diseñó, entonces, el motor diesel para hacerlo operar con aceite vegetal <sup>(08)</sup>.



**Figura No 1:** Reacción de Transesterificación de un ácido graso.

En la Exposición de Paris de 1900 <sup>(09)</sup>, el Dr. Diesel usó como combustible, para una de sus máquinas, el aceite de nuez. Sin embargo, debido a las altas temperaturas generadas, la máquina fue la adecuada para operar con una variedad de aceites vegetales. En la Feria Mundial de Paris de 1911, el Dr. Diesel hizo funcionar su máquina con aceite vegetal de nuez y a su vez declaró: “El motor (máquina) diesel puede ser alimentado con aceites vegetales y ayudará considerablemente en el desarrollo de la agricultura de los diversos países que lo utilicen”. Uno de los primeros usos del aceite vegetal transesterificado fue el de alimentar vehículos en Sudáfrica antes de la segunda guerra mundial. El nombre “biodiesel” ha sido otorgado para describir al aceite vegetal transesterificado que se utiliza como combustible para un motor diesel <sup>(10)</sup>. Los aceites vegetales fueron usados en motores diesel hasta 1920. Durante el año 1920 las manufactureras de motores diesel alteraron el diseño original para utilizar la baja viscosidad del petro diesel, en lugar del aceite vegetal.

El uso de aceites vegetales como una alternativa de combustible renovable, en lugar del petróleo, fue propuesto a inicios de la década de 1980. A partir de estos años se han creado plantas de producción de Biodiesel en varios países de Europa y en algunas ciudades tienen buses que operan con biodiesel puro, o mezclas de petro y biodiesel. Recientemente las compañías Renault y Peugeot han aprobado el uso de biodiesel en algunos de sus camiones. Actualmente la economía doméstica y ambiental ha promovido, a través del mundo, el resurgimiento del uso de biodiesel. En 1991 la



Comunidad Europea (EC) propuso la reducción de un 90% de impuestos para el uso de biocombustibles, incluyendo en biodiesel. Las plantas para la producción de biodiesel son construidas en gran cantidad por varias compañías en Europa; cada una de las cuales producirá hasta 1.5 millones de galones de biodiesel por año. La Unión Europea produjo casi el 89% de toda la producción total de biodiesel en el mundo, durante el año 2005 <sup>(10)</sup>.

Las ventajas de los aceites vegetales como un combustible diesel son: su portabilidad, disponibilidad inmediata, ser renovable, alto valor de calor de combustión (cerca del 88% del combustible de petróleo No. 2), bajo contenido de azufre y lo más importante, ser biodegradable.

## 2.1. CARACTERÍSTICAS DE LA MATERIA PRIMA Y DEL BIODIESEL

El biodiesel, según la norma internacional ASTM D 6751, denominado como B100, es un combustible para motores diesel formado por ésteres de ácido graso monoalquílicos de cadena larga, derivados de aceites vegetales o grasas animales.

**TABLA N°1: PROPIEDADES TÉCNICAS DEL BIODIESEL**

Nombre Común:	Biodiesel.
Nombre Químico Común	Ester Metílico de Acido Graso
Rango de Formula Química	Esteres Metílicos de C14 - C24
Rango de Viscosidad Cinemática	3.3 - 5.2
Rango de Densidad (kg/m <sup>3</sup> a 288 K)	860 - 894
Rango de Punto de Ebullición (K)	> 475
Rango de Punto de Ignición (K)	430 - 455
Rango de Destilación (K)	470 - 600
Presión de Vapor (mmHg a 295 K)	< 5
Solubilidad en Agua	Insoluble
Apariencia Física	Amarillo claro a oscuro
Biodegradabilidad	Mas biodegradable que el Petrodiesel
Reactividad	Estable.

El biodiesel, es una mezcla de ésteres metílicos de ácido graso de cadena larga como: el ácido láurico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, etc. Los que constituyen ejemplos típicos de materia prima son los aceites provenientes de la soya, canola, girasol, palma y otros derivados de fuentes vegetales. Los aceites provenientes de grasas animales y aceite de cocina son también fuentes primarias para la producción de biodiesel. La química de la conversión a biodiesel es esencialmente la misma; donde el aceite o la grasa, reacciona con metanol o etanol en presencia de hidróxido de sodio como catalizador básico, para formar biodiesel y glicerina<sup>(11)</sup>.

## **2.2. BIODIESEL: ALTERNATIVA DE COMBUSTIBLE PARA MOTORES DIESEL.**

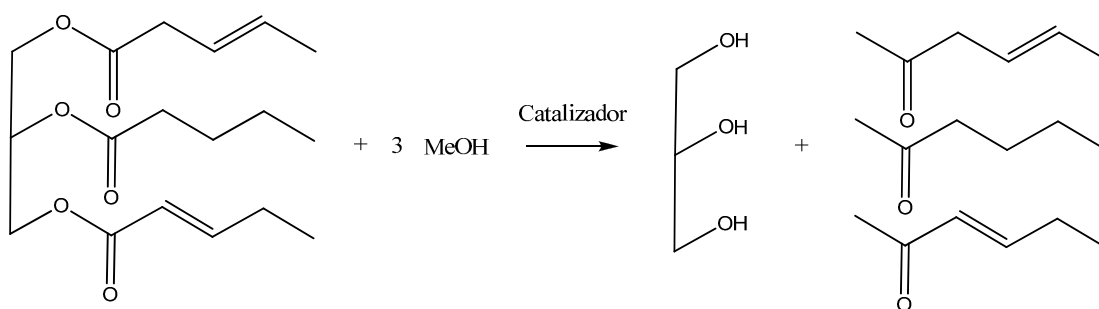
Aceites vegetales, en buenas condiciones, o que han sido previamente usados, como en el caso del aceite de cocina o aceites usados en los vehículos, pueden ser procesados para obtener el biodiesel. En general, las propiedades físicas y químicas y el rendimiento de los ésteres metílicos de ácido graso, en relación al valor de calor de combustión, son también comparables con el petrodiesel. Así mismo, los ésteres metílicos de ácido graso de aceites vegetales (biodiesel) tienen otras ventajas sobresalientes, como alternativas de combustible. El metanol, es un alcohol de bajo costo y como mono alcohol es generalmente usado en la reacción de transesterificación de los triglicéridos, en presencia de un álcali como catalizador<sup>(12)</sup>. Varios aceites como aceite de girasol, soya, semilla de algodón, palma y sus respectivos ácidos grasos pueden ser también usados como aceites vegetales para la producción de biodiesel.

El biodiesel es un líquido de color ámbar – amarillo y su viscosidad es similar a la del petrodiesel. Es no – inflamable, en contraste al petrodiesel, y es no – explosivo, porque tiene un punto de ignición de 423K; en comparación con el petrodiesel cuyo valor del punto de ignición es 337K. El biodiesel, en lugar del petrodiesel, es

biodegradable y no – tóxico y se reducen notablemente las emisiones tóxicas cuando es usado como combustible <sup>(13)</sup>.

### 2.3. PROCESOS DE PRODUCCIÓN DEL BIODIESEL

A nivel mundial, la obtención del **Biodiesel** está centrada en la hidrólisis de ácidos grasos producidos a partir de diferentes fuentes de origen animal o vegetal. A este proceso, comúnmente, se le conoce como **Transesterificación** y puede ser representada mediante la siguiente ecuación química:



**Figura No 2:** Reacción de Transesterificación para Triglicéridos.

En ella, la calidad del aceite cumple un rol muy importante para que la transesterificación se lleve a cabo adecuadamente, la que debe asegurarse mediante un análisis químico previo y de ser necesario un pretratamiento adecuado el metanol, el cual puede ser reemplazado por otro alcohol; como el etanol. Al respecto, considerando la estequiometría de la reacción, se observa que se requieren 3 moles de alcohol, por cada mol de triglicérido y para asegurar que la reacción ocurra completamente, es necesario el uso de un exceso de alcohol. Si no se usa este exceso, el producto obtenido no será biodiesel puro; pudiendo encontrarse una mezcla de biodiesel, triglicéridos sin reaccionar y productos intermedios como monoglicéridos y diglicéridos. Estas impurezas afectan las características del combustible, de manera que no cumple con las

normas técnicas de calidad; además de producir efectos indeseados, como la formación de depósitos carbonosos en el motor, taponeo de los filtros, combustión incompleta, etc.

Así mismo, para que la reacción ocurra, es necesaria la presencia de un catalizador y de ciertas condiciones de reacción, como tiempo, temperatura, agitación.

El Procedimiento que se sigue para la transesterificación alcalina, incluye una secuencia de operaciones:

La primera, consiste en disolver el catalizador sólido (NaOH o KOH) en el alcohol (metanol o etanol). La cantidad de catalizador utilizada depende de la acidez del aceite, la que suele variar entre un 0,5 y 1% (Srivastava y Prasad, 2000). Aproximadamente media hora de agitación constante se necesita para lograr una disolución completa. Este paso puede ser obviado si se trabaja con un catalizador líquido, como el metilato de sodio.

En un reactor cerrado herméticamente, con agitación constante y calor; se realiza la transesterificación propiamente dicha. En plantas de producción pequeñas este proceso se realiza por lotes, pero en plantas de gran escala se realiza en reactores de flujo continuo. En el reactor se mezclan el aceite y el metanol con el catalizador disuelto y se agita durante una hora. Para que la reacción sea completada, se requiere alrededor 1 hora a 60°C de temperatura, ó de 4 horas a 32°C de temperatura (Freedman *et al.*, 1984).

Como resultado de la transesterificación se obtienen dos fases: una fase más viscosa y densa, que consiste en una mezcla de glicerol, jabones, catalizador, metanol y agua (denominada *glicerol crudo*) y una fase más liviana, formada por los metil-ésteres

(el biodiesel), metanol, una menor proporción de catalizador, jabones y mono- y diglicéridos, en el caso que la reacción no haya sido completa.

Así mismo, se requiere de un tanque decantador donde ambas fases se puedan separar por gravedad ó de una centrífuga para separarlas más rápidamente. Con la finalidad de mejorar la separación del glicerol también se puede añadir agua luego de la transesterificación. A partir de este momento, se separan dos líneas de proceso: una para purificar los metil-ésteres y otra para purificar y recuperar el glicerol.

Por otro lado, en Europa donde los estándares de calidad para el biodiesel son mucho más exigentes, existen muchas plantas donde la transesterificación del aceite la realizan en dos etapas. El objetivo de este método es reducir la cantidad de metanol que interviene en la transesterificación y mejorar la eficiencia de la reacción, consiguiendo altas tasas de transformación del aceite y una mayor pureza del en biodiesel.

Este proceso consiste en agregar sólo una parte de la mezcla de alcohol y catalizador en cada etapa y separar el glicerol después de cada etapa (Bradshaw, 1942). La base de este método reside en una característica importante de la reacción química de transesterificación y es que se trata de una *reacción de equilibrio*. Se sabe que éstas pueden ocurrir en los dos sentidos y en el caso de la transesterificación, el aceite y el alcohol reaccionan para producir ésteres metílicos y glicerol; pero al mismo tiempo los ésteres metílicos pueden reaccionar con el glicerol para producir triglicéridos y alcohol nuevamente. Cuando se mezclan el aceite, alcohol y catalizador, la reacción transcurre hasta que alcanzar el equilibrio, momento en el cual ya no se generan más productos. Luego, al mismo tiempo, la reacción ocurre en ambos sentidos, produciéndose un equilibrio dinámico. Como el objetivo del proceso es obtener la mayor cantidad de ésteres, lo ideal es procurar desplazar este equilibrio hacia la derecha de la reacción; es

decir, hacia la formación de los productos. Usualmente, esto se logra cuando se agrega al aceite, primero un 80% del alcohol y el catalizador. Una vez producida la transesterificación, se separa el glicerol y el producto se lleva a una segunda reacción con el 20% de alcohol y catalizador restante (Van Gerpen, 2005).

Otra forma de desplazar el equilibrio hacia la derecha, es agregando más insumos, preferentemente, en una razón molar alcohol: aceite de 6:1 en lugar de 3:1 o retirando, durante el proceso, parte del glicerol y forzando para que la reacción avance aún más para producir el glicerol faltante, necesario para restablecer el equilibrio.

Así mismo, uno de los procesos más simples y más utilizado para fabricar biodiesel, es el de la transesterificación alcalina. Sin embargo, requiere de un aceite con bajo contenido de ácidos grasos libres, agua y otras impurezas, o de procesos de pretratamiento de la materia prima, adicionales, para asegurar esta calidad. Además, requiere de pasos posteriores de postratamiento del biodiesel para reducir su contenido de impurezas procedentes del proceso, principalmente residuos de catalizador, ó de postratamiento de la glicerina para purificarla parcialmente e incrementar su valor de mercado. Es por esto que otros procesos han sido desarrollados para aceites menos puros o para intentar acelerar la reacción, mejorando de este modo el rendimiento de la transesterificación; sin embargo su uso aún no está generalizado.

#### **2.4. TRANSESTERIFICACIÓN ALCALINA CON ETANOL**

Por otro lado, en muchos países se viene experimentando la transesterificación utilizando etanol en lugar de metanol. Las ventajas de este proceso serían la procedencia renovable del alcohol (caña de azúcar, remolacha, maíz, etc.) y su mucha menor toxicidad. Sin embargo, la producción de ésteres etílicos es difícil en comparación con

la de ésteres metílicos, debido principalmente a la fácil formación de emulsiones estables entre el biodiesel y el glicerol, dificultando severamente la purificación del biodiesel (Zhou *et al.*, 2003). Del mismo modo se requiere, entonces, mucho mayor cuidado con la pureza de los insumos así como con los parámetros de reacción; tiempo, temperatura y agitación, para asegurar el éxito. En Brasil, se ha experimentado con un método que usa dos catalizadores para permitir la transesterificación con etanol, con un tiempo de reacción de sólo 30 minutos (Ribeiro, 2004).

Luego de la transesterificación y la separación de las dos fases, biodiesel y glicerol, se requiere de un postratamiento para asegurar que el biodiesel cumpla con los estándares de calidad exigidos, pues éste aún contiene impurezas derivadas del proceso; parte del metanol en exceso, posiblemente jabones y trazas de catalizador.

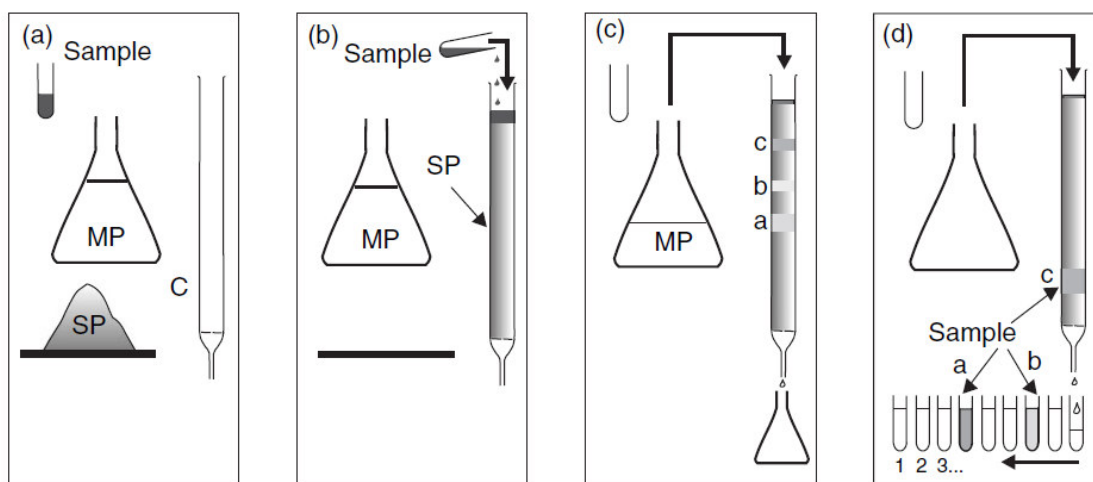
Los metilésteres se someten a temperatura y vacío para evaporar el metanol y recuperarlo y luego son llevados a un proceso de lavado para separar todas las impurezas. El lavado se realiza con agua acidulada (con ácido fosfórico o ácido cítrico) que se mezcla con el biodiesel. El ácido neutraliza el catalizador residual presente y separa los jabones que se puedan haber formado durante la reacción.

Los jabones son convertidos en ácidos grasos libres (se quedan con el biodiesel) y en sales solubles en agua (Van Gerpen, 2005). Los restos de catalizador, jabón, sales, glicerina y metanol se quedan en el agua de lavado. Este lavado se realiza con agua, al menos dos veces cada vez, hasta que se haya eliminado todo el residuo de catalizador alcalino y el efluente tenga un color claro.

Finalmente, los metilésteres lavados se secan, con calor y vacío para separar toda el agua restante. Los filtrados constituyen el producto de este proceso, que viene a ser el **biodiesel**.

## 2.5. ANTECEDENTES SOBRE CROMATOGRAFIA DE GASES.

Una de las formas a través de la cual se separan los componentes de una mezcla y que Tswett, lo denominó CROMATOGRAFIA, fue descubierta por él al tratar de aislar los componentes del colorante verde de los vegetales, usando una columna de carbonato de calcio<sup>(14)</sup>. En ella observó que al iniciarse el proceso se iban formando diferentes bandas; desde el amarillo hasta el verde.



**Figura No 3:** Etapas para el desarrollo de un proceso cromatográfico.

En 1931, Winterstein y Lederer usando esta técnica separaron el alfa y beta caroteno. En 1941, Martin y Synge nos informan sobre la Cromatografía de Reparto y tras años de estudio de extracción líquido – líquido en contracorriente, observaron que para aumentar la eficiencia de la separación era necesario que los líquidos involucrados debieran encontrarse en forma de gotas muy pequeñas. Sin embargo, éstas formaban emulsiones e impedían la separación. Para superar este inconveniente, fijaron las gotas



de una fase sobre un soporte sólido y dejaron correr sobre dicha fase al líquido de extracción.

Al añadir agua y una mezcla de aminoácidos acetilados a uno de los primeros soportes usados, como lo fue el gel de sílice molido, y teniendo como fase móvil al cloroformo; lograron separar la acetil leucina y la acetil alanina. Al respecto, Martin y Synge en 1941, en uno de sus comentarios sobre el desarrollo de la Cromatografía líquido – líquido, establecieron las bases de la Cromatografía Gaseosa. Ellos suponían que: “No era necesario que la fase móvil sea un líquido, sino que también puede ser un gas. También sería posible realizar separaciones muy refinadas, de sustancias volátiles, a través de una columna en la que se hiciera fluir un gas en forma permanente; a través del gel de sílice impregnado con un solvente no volátil y en el cual las sustancias a separar obedecieran, con ciertas limitaciones, a la Ley de Raoult”.

Sin embargo, hasta 1952 no se realizaron aplicaciones directas y fue el mismo Martin quien en dicho año publicó su trabajo: “The Separation of volatile fatty acids from formic to dodecanoic acid”. Este fue el primer trabajo de Cromatografía de Reparto en Fase Gaseosa y como reconocimiento a su labor en el descubrimiento de la cromatografía gas – líquido, Martin y Synge recibieron el premio Nobel de Química en ese mismo año <sup>(15)</sup>.

Por su parte, la cromatografía puede ser clasificada como:

- De Gases: Gas – Líquido y Gas Sólido.
- De Líquidos: Líquido – Líquido y Líquido – Sólido.

Si la fase móvil es un gas, la modalidad cromatográfica se denomina gaseosa (GC) y si es un líquido, cromatografía líquida (LC). A éste último pertenecen la

cromatografía en capa delgada (TLC), la cromatografía líquida en columna abierta y la cromatografía líquida de alta performance (HPLC).

La cromatografía gaseosa se emplea para separar mezclas que contienen compuestos orgánicos volátiles, pero suele presentar grandes dificultades: cuando las sustancias a analizar no son volátiles, si se descomponen a altas temperaturas o poseen alto peso molecular.

Se ha estimado que sólo un 20% de las sustancias orgánicas conocidas puede separarse por GC sin tratamiento <sup>(16)</sup>.

La diferencia fundamental entre GC y HPLC se encuentra en el tipo de detectores y en la influencia de la fase móvil. En GC es muy simple encontrar detectores que diferencien la muestra de la fase móvil (gas inerte). La otra diferencia fundamental entre ambas se refiere a la influencia de la fase móvil en la separación. En GC la fase móvil es un simple transportador del soluto y prácticamente no influye en la separación; donde el tipo de gas a utilizar se selecciona únicamente en función del detector a emplear; a diferencia del HPLC donde la fase móvil es el parámetro fundamental que gobierna la separación. De ahí que, en GC se necesiten muchas columnas para abarcar el rango de separaciones posibles, mientras que en HPLC, con una sola columna es posible separar sustancias polares, iónicas, ionizables y no polares, sólo se requiere modificar la composición de la fase móvil <sup>(17)</sup>.

Dependiendo del mecanismo de separación cromatográfica, es posible realizar otro tipo de clasificación: Por Adsorción y por Reparto.

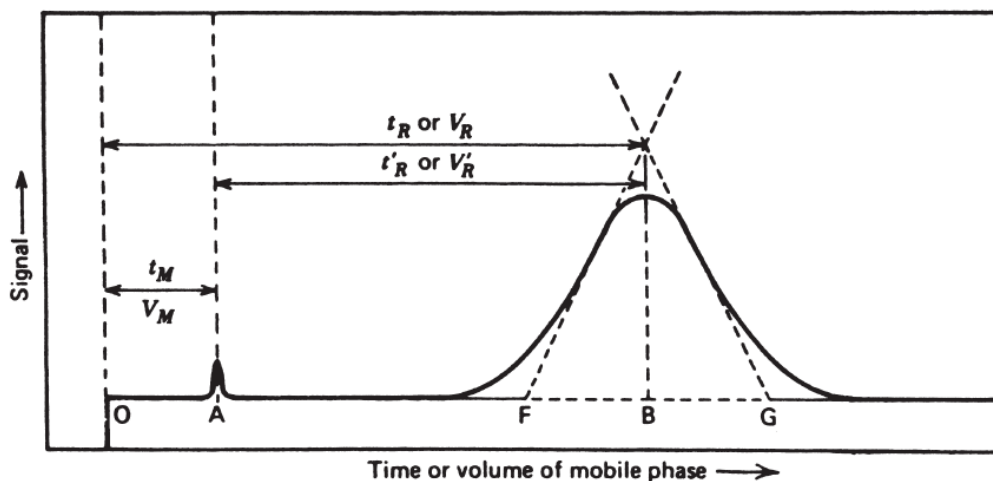
**Por Adsorción**, la separación se produce debido a diferencias en la capacidad de adsorción de los componentes de una mezcla sobre la fase estacionaria. Para

separaciones eficientes es necesario que la fase estacionaria sea un sólido de gran superficie y la fase móvil puede ser un gas o un líquido. Los enlaces entre las moléculas adsorbidas y el adsorbente deben ser débiles para que la fijación sea reversible. El reparto de los compuestos entre la fase móvil y la estacionaria, está regido por las isothermas de Langmuir.

**Por Reparto**, la fase estacionaria debe ser un líquido, para que las separaciones puedan realizarse tanto en la fase líquida como en la fase gaseosa. La separación es producida debido a pequeñas diferencias entre los coeficientes de reparto de cada soluto; entre los dos líquidos o entre el gas y el líquido y debido a la solubilidad, algunos compuestos quedarán más retenidos que otros. La cromatografía de papel y gas – líquido están basadas en dicho mecanismo.

## 2.6. TERMINOLOGIA APLICADA EN CROMATOGRAFIA.

**Cromatograma:** Es la representación gráfica de la respuesta del detector en función del volumen del gas portador o del tiempo.



**Figura No 4:** Componentes de un cromatograma.

- Línea base: Es el gráfico que realiza el registrador cuando solo está siendo detectado el gas de arrastre.
- Pico: Es la porción del cromatograma que registra el detector cuando se eluye un componente.
- Tiempo de retención ( $t_R$ ): Es el tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la salida del pico de interés.
- Tiempo de retención ( $t_M$ ): Es el tiempo de retención de un compuesto no retenido.
- Tiempo de retención ( $t'_R$ ): Es el tiempo de retención ajustado.
- Volumen de retención ( $V_R$ ): Es el volumen de gas de arrastre necesario para eluir el compuesto. Se calcula con la siguiente fórmula:  $V_R = t_R \times F_0$ , donde  $F_0$  es el caudal del gas transportador.

**Constante de distribución ( $K_C$ ):** Es la medida de la relación entre el estado del soluto en la fase estacionaria, con respecto al estado en la fase móvil.

$$K_c = \frac{[A]_S}{[A]_M}$$

$[A]_S$  : la concentración del soluto en la fase estacionaria y,

$[A]_M$  : la concentración del soluto en la fase móvil.

**Velocidad Lineal ( $K_C$ ):** Indica cuántos centímetros por segundo, recorre el gas de arrastre en la columna cromatográfica.

**Eficiencia de Columna o Número de Platos Teóricos:** La eficiencia de la columna está expresada como la relación entre el tiempo de retención y el incremento de ancho de banda o

ancho de pico. Lo deseable es obtener picos de anchos pequeños y simétricos. La eficiencia de la columna puede expresarse como el Número de Platos Teóricos. Cuanto más grande sea dicho valor, mayor será la eficiencia de la columna.

$$N = \left( \frac{t_R}{\sigma} \right)^2 = 16 \left( \frac{t_R}{w_b} \right)^2 = 5.54 \left( \frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

N: Número de Platos Teóricos.

$t_R$ : Tiempo de Retención.

$w_h$ : Anchura media del pico cromatográfico

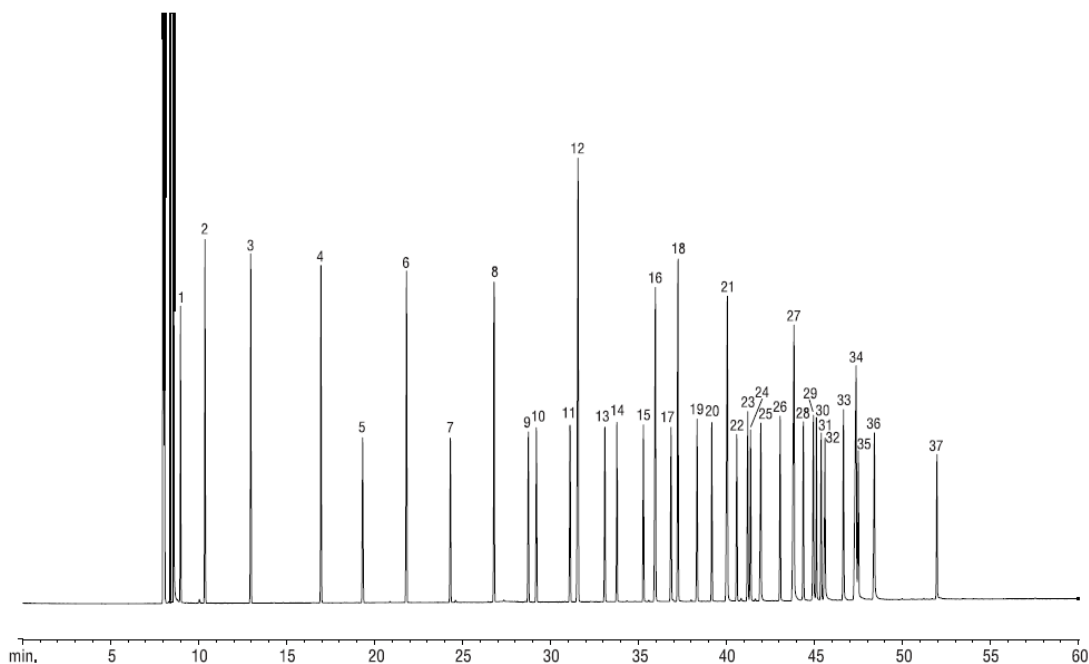
## 2.7. CROMATOGRAFIA DE GASES.

La cromatografía de gases incluye todos los métodos cromatográficos en los que la fase móvil es un gas y debido a las propiedades características de los gases, como: intensidad de la atracción molecular, difusividad, viscosidad, energía superficial y densidad, existen diferencias fundamentales entre cromatografía en fase líquida y en fase gaseosa.

Los gases en contraste a los líquidos, prácticamente, no presentan interacciones entre sus moléculas, ni tienen capacidad para desalojar las moléculas de soluto no volátiles de la fase estacionaria. Sin embargo, la fase móvil líquida sí puede realizar este desplazamiento confiriéndole a ella un grado de libertad más con respecto a la fase móvil gaseosa. La relación de las fuerzas intermoleculares entre gases y líquidos es aproximadamente 1:10000 <sup>(18)</sup>.

La alta resolución y velocidad de separación en la cromatografía en fase gas, se debe principalmente a la difusividad de los gases. Otro factor importante en la cromatografía en fase gaseosa es la baja viscosidad de los gases que permite utilizar columnas de mayor longitud. Así mismo, las moléculas de los líquidos poseen energía superficial (tensión superficial), que no presentan los gases y, generalmente, esta energía se utiliza en cromatografía de papel y en la cromatografía de capa fina, como fuerza impulsora de la fase móvil.

En la cromatografía gaseosa, a excepción de la preparativa, se hacen separaciones a nivel micro analítico y considerando lo anterior, la cromatografía de gases se puede clasificar de la siguiente manera:



**Figura No 5:** Cromatograma típico en cromatografía de gases.

- **Cromatografía Gas – Sólido:** Donde la fase estacionaria es un sólido adsorbente y la separación cromatográfica se lleva a cabo por la diferencia de adsorción entre los diferentes componentes de la muestra sobre la fase estacionaria. Los picos de los cromatogramas siempre presentan asimetrías, debido a que el equilibrio en la distribución de los componentes a separar, entre fase sólida y gaseosa, está regido por isothermas no lineales. Generalmente, se le usa para separar gases permanentes que serían muy difícil aislarlos en fase estacionaria líquida.

Las desventajas que presenta son: Adsorción irreversible, actividad variable de los adsorbentes, adsorción excesiva de los compuestos polares y efecto catalítico. Las separaciones se llevan a cabo a temperaturas superiores a las del punto de ebullición del compuesto menos volátil, viéndose afectadas las separaciones sobre todo la de los compuestos inestables.<sup>(19)</sup>

- **Cromatografía Gas - Líquido:** La fase estacionaria es un sólido de gran superficie absorbente sobre la que se deposita la fase líquida poco volátil. La separación cromatográfica se debe a la diferencia de coeficientes de reparto de los solutos en la fase líquida. Este tipo de cromatografía se ha extendido más que la de Gas – Sólido, debido a que las bandas de elución son muy estrechas; dando lugar a picos simétricos y donde el equilibrio de distribución se alcanza rápidamente, permitiendo velocidades lineales altas. Las limitaciones de ésta técnica es que no permite trabajar con compuestos no volátiles o muy volátiles, como los gases permanentes CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, O<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub><sup>(20)</sup>.

## 2.8. EL CROMATOGRAFO DE GASES.

Un instrumento de cromatografía de gases consta principalmente de las siguientes partes:

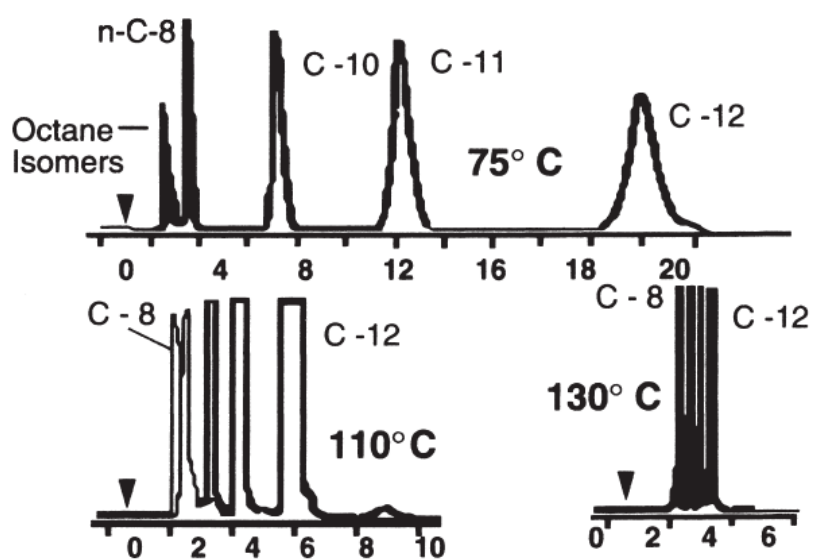
- Fuente del Gas portador (Gas de arrastre).
- Puerto de inyección de muestra.
- Horno de columna.
- Detector.
- Registrador o procesador de datos.

El gas portador es un gas inerte de alta pureza: He, N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, etc, contenidos en balones de presión provistas de reguladores de presión.

La cámara de inyección tiene por objeto vaporizar las muestras en estado líquido, por tanto la temperatura debe ser superior a la del componente de ebullición menos volátil de la mezcla.

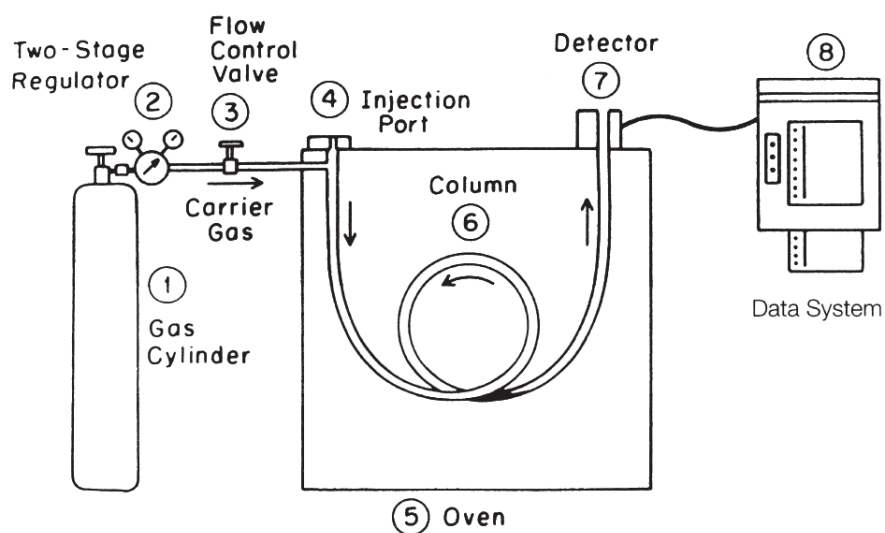
La columna cromatográfica puede ser empacada o capilar. La temperatura del horno de columna se fija de manera tal que el coeficiente de reparto del compuesto menos volátil de la mezcla, tenga un valor tal que haya suficientes moléculas en la fase vapor para que sea posible la emigración de todas las bandas de elución y se puedan conseguir separaciones en tiempos razonables.





**Figura No 6:** Efecto de la temperatura sobre el tiempo de retención.

El detector mide las variaciones de concentración originadas por la elución de las bandas correspondientes a cada compuesto y registrarlas en forma de cromatograma <sup>(21)</sup>.



**Figura No 7:** Esquema general de un cromatógrafo de gases

## **2.9. FASE MOVIL O GAS DE ARRASTRE.**

Este componente ha de ser un gas inerte, no soluble en la fase líquida, generalmente los gases que se usan son: He, H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, etc.

Los factores que determinan la selección del gas de arrastre son: eficiencia de la columna y sensibilidad del detector. El segundo criterio es el más importante a tomar en cuenta, cuando se realiza una selección de gas portador <sup>(22)</sup>.

### **Influencias de la fase móvil en las separaciones:**

Efecto de la presión: Una velocidad óptima y una presión elevada, mejora la resolución; al igual que cuando se emplean columnas de mayor longitud, donde es necesario aumentar la presión para conseguir el número de platos teóricos requeridos.

Presión programada: Cuando se programa la presión en la columna del gas de arrastre se obtiene mayor resolución de picos. Sólo los equipos más sofisticados presentan esta alternativa en su construcción.

Efecto del flujo: El caudal se puede variar de manera que la separación se realice en forma más rápida o más lenta, siempre y cuando la resolución sea buena.

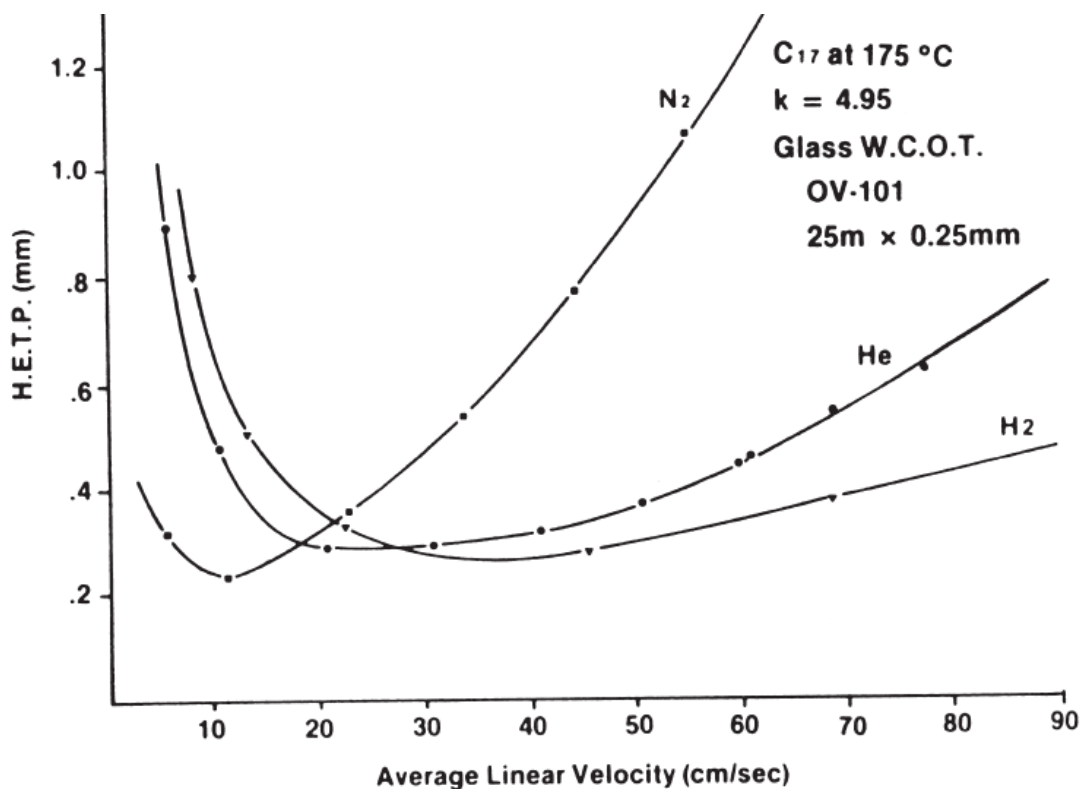
### **Regulación del flujo y su Medida**

Cuando se trabaja con temperatura programada se hace necesaria la regulación de la burbuja; pero actualmente los equipos cuentan con un medidor de flujo en el mismo sistema.

## Selección del gas portador

Generalmente, en cromatografía de gases, se usan el Helio y Nitrógeno dependiendo del detector usado y de si se están usando columnas capilares o empacadas. El gas helio, debido a su alta conductividad térmica se usa con los detectores de conductividad térmica (TCD). También se le usa con los detectores de ionización por flama (FID); pero con columnas capilares.

Por su parte, el gas nitrógeno se usa con detectores FID y cuando se trabaja con columnas empacadas.



**Figura No 8:** Efecto del gas de arrastre según curvas de la ecuación de Van Dempster.

## 2.10. COLUMNAS CROMATOGRÁFICAS.

Las columnas, en cromatografía de gases, se dividen en columnas empacadas y columnas capilares.

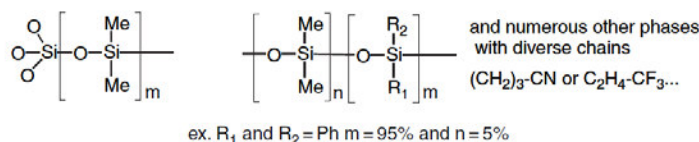
### **Columnas Empacadas**

El empaque proporciona una superficie para depositar una película muy fina de fase líquida. Estos soportes deben tener una estructura que contribuya a la eficiencia de la columna y ciertas características superficiales que le dan intervención o no en las reacciones físicas o químicas de los solutos. Los soportes deben mostrar una gran área superficial; de manera tal que la fase líquida pueda extenderse fácilmente en forma de película y a la vez sea posible su interacción con las sustancias que se trasladen en el gas de arrastre. Este soporte debe tener cierta resistencia para que no se deteriore con el paso del gas de arrastre a determinadas presiones. También debe ser estable térmicamente y poroso para no producir caída de presión.

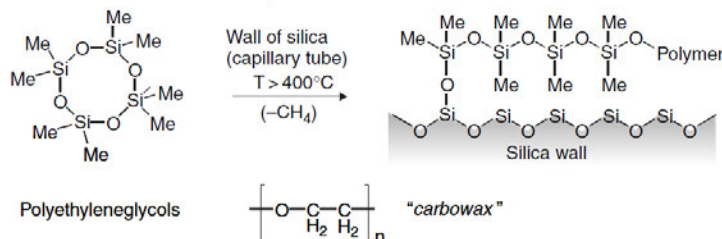
El primer empaque sólido que se usó fue la tierra de diatomáceas (tamaño de partícula: 20 – 40  $\mu\text{m}$ ), luego se introdujo el uso del ladrillo refractario, posteriormente se han usado un sinnúmero de empaques inertes.

Los soportes sólidos, formados por residuos de diatomáceas son básicamente grupos silanol ( $\text{Si-OH}$ ) y siloxanos ( $\text{Si-O-Si}$ ). El grupo silanol actúa como donador de protones y el siloxano como aceptor; pero el grupo ácido es mucho más efectivo en formar el puente de hidrógeno que el oxígeno, por lo que el grupo silanol es el que rige las propiedades adsorbentes de los soportes silíceos. Los compuestos más polares (agua, alcoholes, aminas) son los que dan más cola ya que forman puentes de hidrógeno <sup>(23)</sup>.

Bonded polysiloxanes (examples):



Method of formation of a bonded phase



**Figura No 9:** Estructura química de los polisiloxanos y polietilenglicol.

## Columnas Capilares

Las columnas capilares son básicamente tubos de diámetro pequeño, cubiertos con una película de fase estacionaria líquida. Una columna capilar está compuesta de tres partes:

1. Tubo de sílica fundida: Está hecho de cuarzo sintético que contiene menos de 1 ppm de impurezas metálicas. Se usan láseres micrómetros para asegurar un diámetro constante. El proceso de manufactura de las columnas purifica e inactiva la superficie interna del tubo. Esto se hace para minimizar la actividad química y crear una superficie uniforme para la fase estacionaria.
2. Cubierta de poliamida: La cubierta exterior está hecha de poliamida para un mejor manejo y flexibilidad de las columnas.
3. Fase Estacionaria: Es un polímero que está cubriendo la pared interna del tubo de sílica. La uniformidad, espesor y su naturaleza química son muy

importantes. Es, precisamente, la fase estacionaria la que tiene gran influencia en las separaciones obtenidas. La más común de las fases estacionarias son los polímeros de sílice. Los tipos y cantidad de sustitución de polisiloxanos distinguen cada fase estacionaria y sus propiedades. La descripción de la fase está referida a la cantidad y al tipo de sustitución en el polisiloxano original.

- Fases estacionarias enlazadas químicamente con el tubo de sílica (Cross – Linked): Con éstos nombres se conocen a las fases estacionarias que están enlazadas al tubo de sílica fundida mediante enlaces covalentes. Estos enlaces le añaden propiedades de mayor resistencia a las columnas además que dichas columnas pueden ser enjuagadas con determinados solventes cuando existe algún tipo de contaminación <sup>(24)</sup>.

### **Longitud de Columna**

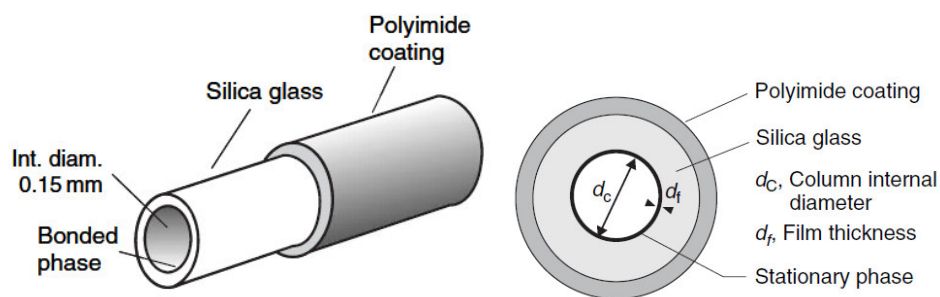
Los efectos de la longitud de la columna se hacen menos importantes conforme la longitud de columna se incrementa. Las columnas más usadas son las de 20 a 30 metros de longitud. Columnas de 60 metros se usan para compuestos muy complejos y se dice que a mayor longitud de columna, habrá mayor sangrado y también, mayor retención.

### **Diámetro de la Columna**

Influye en la eficiencia, naturaleza de la retención y capacidad de la muestra. Se dice que a menor diámetro se obtiene mayor eficiencia y a mayor diámetro se obtiene mayor resolución y mayor capacidad de muestra.

## Sangrado de la columna

Se refiere a la elución de la fase estacionaria (degradación del polímero). Generalmente, se presenta y no es necesariamente un signo de daño. La cantidad de sangrado se incrementa con el espesor de película, diámetro de columna y su longitud. Se dice que las fases estacionarias polares sangran más que las fases no polares <sup>(25)</sup>.



**Figura No 10:** Estructura de una columna de tipo capilar.

## 2.11. INYECCION DE MUESTRA.

Atendiendo al estado de la muestra y tipo de columna; existen diferentes métodos para introducir la muestra al caudal del gas portador, entre ellos se tiene

### Para Sistemas con Columnas Empacadas

Muestreador para muestras gaseosas; donde el sistema de válvula y el loop de muestra permite introducir muestras gaseosas con solo una pequeña diferencia de presión. Una presión de  $0.1 \text{ kg/cm}^2$ , más que la presión atmosférica, es suficiente para introducir la muestra.

1. Microjeringa: Es el método más popular para introducir muestras líquidas a través de un septum de jebes en la cámara de inyección. También

algunas muestras sólidas después de disolverlas en algún solvente se pueden introducir de esa manera.

2. **Pirolizador:** Se le usa principalmente para muestras poliméricas que necesitan una alta temperatura para pirolizar, obteniéndose productos de pirolisis. Sin embargo, se debe tener mucho cuidado al seleccionar la temperatura de pirolisis; pues una muy alta o muy baja temperatura perjudicaría el proceso de descifración.

### **Para Sistemas con Columnas Capilares**

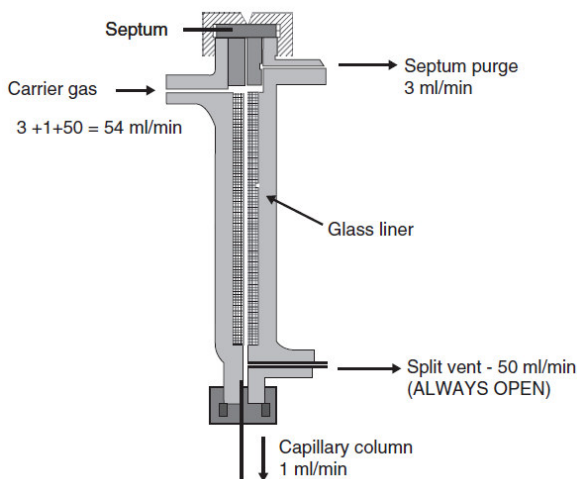
1. **Sistema Split:** Es el sistema más antiguo y el más popular en técnicas de inyección de muestra en columnas capilares. Una columna capilar acepta 10 a 100 ng como máximo para una buena separación; de ahí que la mayor parte de la muestra no debe ser ingresada a la columna. Este sistema es usado con muestras altamente concentradas, en el orden de 0,1 a 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Generalmente se inyectan volúmenes de 1 a 2  $\mu\text{L}$ ; pero pueden inyectarse, sin ningún problema, hasta 5  $\mu\text{L}$ . La muestra es vaporizada inmediatamente después de la inyección y luego mezclada con el gas portador. Una pequeña cantidad de gas portador ingresa con la muestra, mientras otra muy grande se va por el split vent. Solo una pequeña cantidad de la muestra pasa, entonces, a través de la columna. El flujo total de gas que pasa a través del inyector en el momento de la inyección, es un poco alto y se refiere a la suma del flujo de la columna y el flujo del split vent. La muestra, rápidamente, entra a la columna, lo cual explica lo eficiente de la inyección Split; pero además los



compuestos volátiles no tienen suficiente tiempo para vaporizarse por completo, antes de que sean descargados por el split vent.

Relación de Split: Es la cantidad de muestra que entra a la columna, depende del flujo del gas de arrastre y del flujo del split vent. Éste valor se denomina relación de split y normalmente se reporta como si el flujo de la columna fuera de 1. Normalmente, la relación de split es 1:50 y 1:200 y la relación 1:50 indicaría que una parte de la muestra entra dentro de la columna y 49 partes son descargados por el split vent. Por tanto 1/50 de la muestra total inyectada, teóricamente, ingresa a la columna. Se usa para muestras muy concentradas o columnas de diámetro muy pequeños.

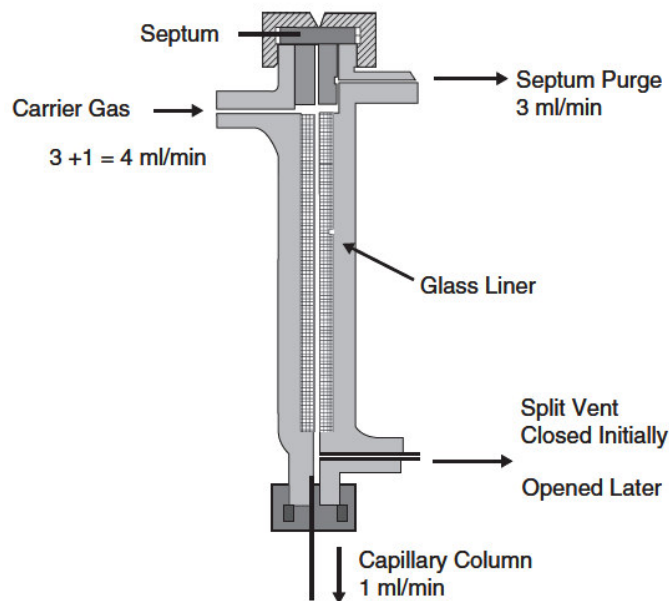
$$\text{Split ratio} = \frac{\text{Flujo de columna}}{\text{Flujo del Split vent}}$$



**Figura No 11:** Esquema de un puerto de inyección tipo split.

- 2. Sistema Split/Splitless:** La idea básica fue formulada por el Dr. Grob. El inyector splitless es similar al de un sistema split. Este método es usado

cuando se quieren analizar compuestos en trazas. La muestra inyectada es vaporizada y transportada por el gas de arrastre. En el momento de la inyección, el flujo dentro del inyector es el mismo que en la columna (1 a 2 mL/min). Quince a noventa segundos después del momento de inyección, un flujo adicional de gas portador es introducido al inyector. Esto permite purgar el gas del inyector de algún residuo de muestra que no entró en la columna.



**Figura No 12:** Esquema de un puerto de inyección tipo splitless.

3. **Inyección en columna (On-column injection OCI):** Es una técnica que no implica la vaporización de la muestra. Dicha muestra es depositada directamente en la columna con una jeringa. Este método permite un rendimiento de columna óptimo, ya que elimina efectos de discriminación y degradación, que pueden resultar de las técnicas con

vaporización de muestras. Se le usa generalmente con compuestos de alto punto de ebullición <sup>(26)</sup>.

## **2.12. DETECTORES.**

Los compuestos eluidos por el gas portador son medidos a la salida de las columnas mediante detectores especiales.

### **Clasificación de los detectores**

1. Destructivos y no destructivos: Como su mismo nombre lo indica son detectores que destruyen o no los componentes eluidos.

Destructivos: Detector de ionización de flama (FID), detector termoiónico de flama (FTD), etc.

No destructivos: Detector infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR), detector de conductividad térmica (TCD), etc.

2. Discriminativos y no discriminativos: Los detectores comunes son no discriminativos, ya que dan información de la cantidad de muestra pero no la identifican.

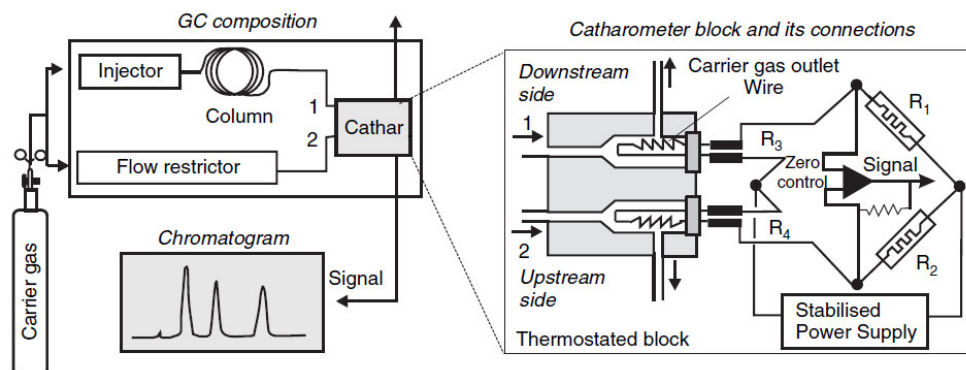
Los detectores discriminativos son los espectrómetros de masa (GC/MS) y los detectores FTIR; pero en la transición de los detectores comunes y los discriminativos existen una variedad de detectores que se les usa para detectar determinadas sustancias: Fósforo, Nitrógeno, Azufre, Cloro, etc. <sup>(27)</sup>.

## Características de los detectores

1. Sensibilidad y límite de detección: Se le denomina así a la capacidad del detector para identificar compuestos a muy bajas concentraciones. Siempre está ligada a la relación señal : ruido electrónico que poseen los detectores.
2. Rango lineal de respuesta: Se refiere al rango en el cual la respuesta del detector es lineal <sup>(28)</sup>.

## Principales tipos de detectores

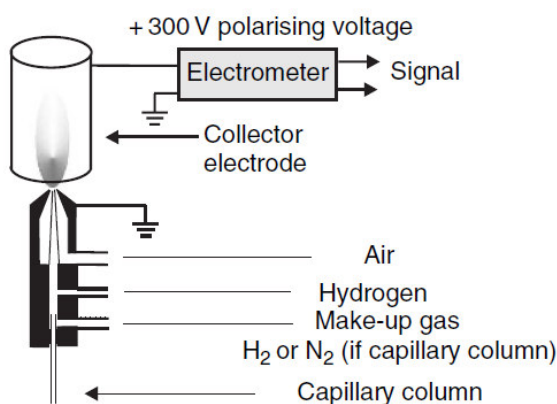
1. **Detector de conductividad térmica (TCD):** Fue el primer detector que se usó. Miden la diferencia de conductividad entre el gas de arrastre puro y la mezcla con un determinado soluto. Se debe usar un gas de arrastre de alta conductividad térmica como el helio <sup>(29)</sup>.



**Figura No 13:** Esquema de detector de conductividad térmica (TCD).

2. **Detector de ionización de flama (FID):** Es un detector para compuestos orgánicos en general. Es el detector mas estable dentro de la amplia gama de detectores para cromatografía de gases que existe. Su rango dinámico

es de  $10^7$ . Es un detector que se usa para analizar componentes en trazas. Puede detectar partes por billón como máximo y niveles de partes por millón ordinariamente. La respuesta molar se incrementa con el número de átomos de carbono y decrece con la existencia de oxígeno, azufre o halógenos. Es un detector que usa una mezcla de aire sintético e hidrógeno en la cual los compuestos orgánicos se ionizan alterando la corriente que es medida a través de un electrómetro. Cuando algún compuesto orgánico es eluido, la corriente detectada varía y es posible cuantificar ya que la variación es proporcional a la concentración del compuesto <sup>(30)</sup>.



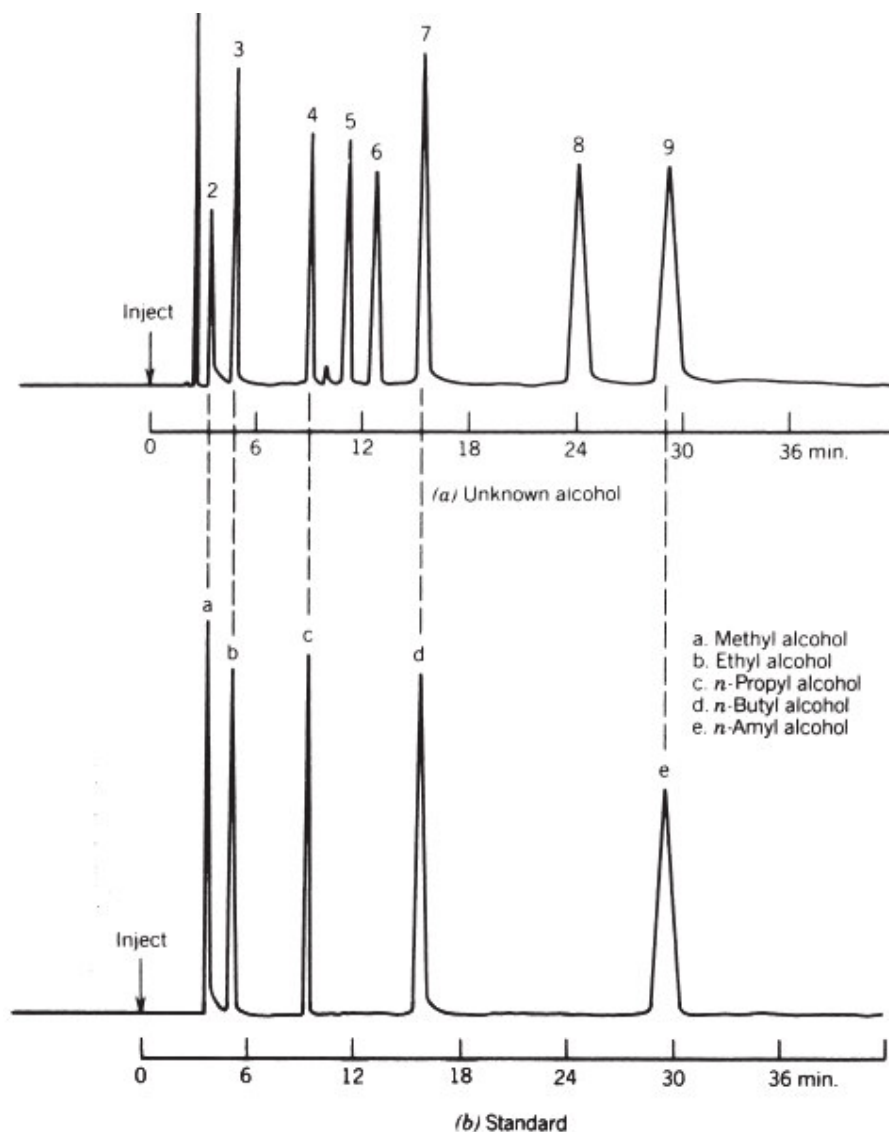
**Figura No 14:** Esquema del detector de ionización por flama (FID).

### 2.13. ANALISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO EN CROMATOGRAFIA DE GASES.

La técnica puede ser usada, tanto para análisis cualitativo como para análisis cuantitativo. Un cromatógrafo con detector FID, es más útil emplearlo para realizar un análisis cuantitativo que cualitativo.

## 2.14. ANALISIS CUALITATIVO.

El tiempo de retención es el parámetro más utilizado para el análisis cualitativo. Sin embargo, como los tiempos de retención no pueden confirmar la identidad del pico; para fines del análisis cualitativo es preferible usar la técnica de cromatografía de gases con detector de masa.



**Figura No 15:** Análisis cualitativo en Cromatografía de gases

El tiempo de retención de un determinado analito puede ser usado para su identificación, si sólo se mantienen constantes la longitud, la fase estacionaria, el espesor, la temperatura y presión (flujo del gas de arrastre) de la columna cromatográfica.

Si el número de compuestos a determinar es grande, este procedimiento puede no ser efectivo y los volúmenes de retención, por lo general, no son exclusivos de los analitos. Para realizar una mejor identificación, es posible utilizar la técnica de los índices de Kovats <sup>(31)</sup>.

## **2.15. ANALISIS CUANTITATIVO.**

Mediante cromatografía de gases y dependiendo del tipo de análisis que se desee realizar, existen múltiples métodos de cuantificación; dependiendo si se cuantifican analitos en concentraciones altas, bajas o a nivel de trazas. Al respecto existen y se aplican diferentes métodos.

## **2.16. METODO DE NORMALIZACIÓN DE ÁREAS.**

Este método está referido al cálculo del porcentaje del área de los picos del cromatograma, asumiendo que es igual al porcentaje en peso. En la siguiente ecuación, si X es el analito desconocido se tendrá lo siguiente:

$$\text{Área \%X} = \left[ \frac{A_x}{\sum_i (A_i)} \right] \times 100$$

$A_x$  : Área del analito X en el cromatograma.

El denominador se refiere a la suma de las áreas de todos los picos presentes en el cromatograma.

Así mismo, para que el método sea lo más exacto posible, todos los analitos deben

- Eluir de la columna cromatográfica.
- Ser detectados.
- Tener la misma sensibilidad (Masa/Respuesta).

Sin embargo, cumplir con estas tres condiciones es muy difícil, a pesar de que es un método muy simple y que ayuda a identificar compuestos que no han sido identificados o que no están disponibles en su forma pura <sup>(32)</sup>.

## **2.17. METODO DE NORMALIZACIÓN DE ÁREAS, CON FACTOR DE RESPUESTA.**

Si existen estándares de los analitos que se desean cuantificar, la tercera limitación en el método de cuantificación anterior puede ser eliminada. Es posible correr estándares para obtener factores de respuesta de cada analito a determinar y luego de analizar el estándar, se calcula el factor de respuesta,  $f_i$ , para cada analito:

$$f_i = \frac{w_i}{A_i}$$

$A_i$  : Área del estándar.

$W_i$  : Peso contenido en la solución estándar.

Mediante este cálculo, la ecuación del método de normalización de áreas cambia por otra ecuación:

$$Peso \%X = \left[ \frac{A_x(f_x)}{\sum_i (A_i f_i)} \right] \times 100$$

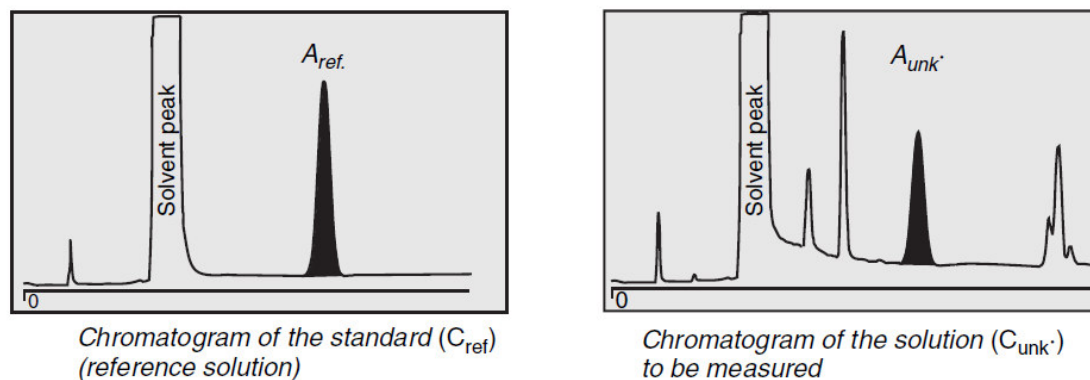


## 2.18. METODO DE ESTÁNDAR EXTERNO.

Generalmente, es el método más utilizado en cromatografía de gases y está incluido en la mayoría de software de control del cromatógrafo, donde cantidades conocidas del analito de interés son analizadas al integrar sus áreas y con un factor absoluto creado con estándares; expresado en peso por unidad de área y que es almacenado en el archivo del software para cada analito.

Cuando una muestra desconocida es analizada, los valores de concentración son determinados multiplicando dichos factores por los respectivos valores de área de cada analito. Para elaborar la curva de calibración, es posible usar múltiples estándares; pero también se puede cuantificar usando un solo estándar. Para el caso que se requiera cuantificar cantidades presentes en trazas, es muy recomendable utilizar una curva de calibración con múltiples estándares. Sin embargo, cuando se trate de analizar concentraciones altas, como porcentaje en peso, sólo se necesita un solo estándar para realizar la cuantificación.

La desventaja de éste método es que la concentración depende directamente del área del pico cromatográfico, es decir, varía directamente con la masa de analito inyectada en el puerto de inyección. Esta es la razón por la que se recomienda que el cromatógrafo debe tener un inyector automático.



**Figura No 16.** Aplicación del Método del estándar externo.

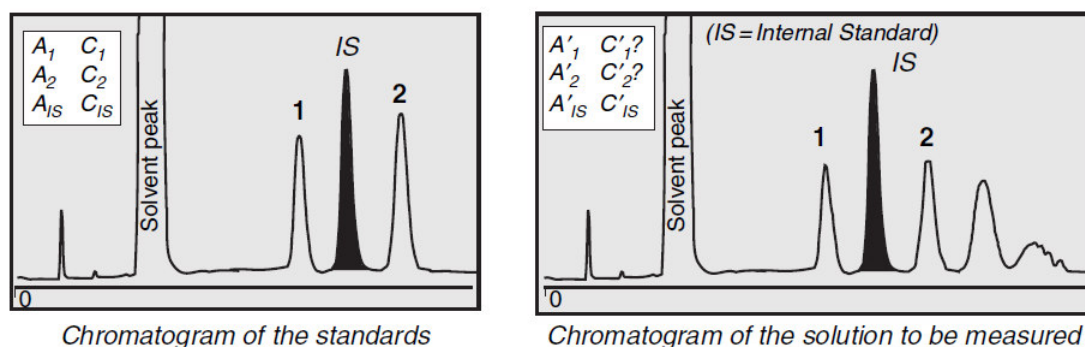
A partir de la siguiente ecuación, se calcula la concentración de la muestra ( $C_{\text{unk}}$ ) relacionando la concentración del estándar ( $C_{\text{ref}}$ ) con el área del pico de la muestra ( $A_{\text{unk}}$ ) con el área del pico del estándar ( $A_{\text{ref}}$ ) <sup>(33)</sup>.

$$C_{\text{unk}} = C_{\text{ref}} \frac{A_{\text{unk}}}{A_{\text{ref}}}$$

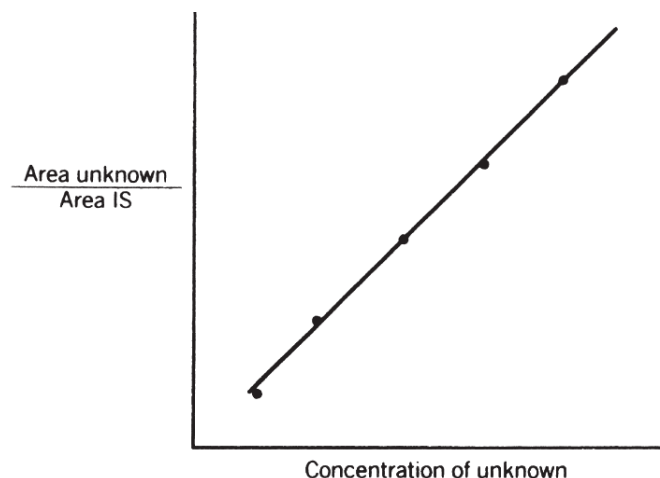
## 2.19. METODO DE ESTÁNDAR INTERNO.

Este método es muy útil para cuantificaciones que carecen de reproducibilidad y cuando se realizan inyecciones manuales. El método del estándar interno no requiere un volumen de inyección exacto; tanto para la solución estándar como para la muestra. El estándar interno debe ser otro estándar diferente y que no interfiera con los picos de los analitos a cuantificar. Al igual que cualquier estándar, debe estar disponible en alta pureza y entre sus características se considera que debe:

- Ser eluido cerca a los compuestos de interés.
- Presentar buena resolución con respecto al pico de cuantificación.
- Ser químicamente similar a los analitos de interés y no debe reaccionar con los compuestos presentes en la muestra.



**Figura No 17.** Aplicación del Método del estándar interno.



**Figura No 18.** Curva de calibración, usando Método del estándar interno.

En la Fig. 19, se observa que el área no es directamente proporcional a la concentración y a lo que se refiere es a la relación de áreas del estándar del analito respecto al área del estándar interno, lo cual corrige cualquier error por inyección de muestra al cromatógrafo. Al igual que el método del estándar externo, la cuantificación puede ser realizada mediante una curva de calibración para concentraciones en trazas y con un solo estándar cuando la concentración es alta <sup>(34)</sup>.

## 2.20. TRATAMIENTO ESTADISTICO DE RESULTADOS.

Los métodos estadísticos mediante los cuales se pretende describir las características más importantes de un conjunto de datos, provengan estos de una muestra o de una población, utiliza herramientas estadísticas como la representación gráfica, cuadros estadísticos, medidas de posición y de variabilidad. Para estimar los parámetros de la población, estos métodos utilizan datos muestrales y al proceso de utilizar estos datos para llegar a conclusiones acerca de los verdaderos parámetros de la población, se le llama inferencia estadística. Esta Estadística generaliza los resultados observados en una muestra, a toda la población bajo estudio, mediante el planteamiento de pruebas de hipótesis y cálculo de intervalos de confianza. Aplicado a la estimación

del rendimiento promedio de un proceso químico, se verifican las especificaciones de producción a partir de mediciones efectuadas sobre muestras <sup>(35)</sup>.

Así mismo, el diseño de experimentos no es nada nuevo. El ser humano también ha desarrollado un sistema para la resolución de problemas y que se conoce como “método científico”, el cual incluye las siguientes etapas:

1. Situación y definición del problema
2. Formulación de una hipótesis por explicarla
3. Obtención de datos.
4. Confrontación de la hipótesis con los datos.
5. Aceptación o rechazo de la hipótesis según esté o no de acuerdo con los datos.

Son materia de juicio crítico la confrontación de la hipótesis con los datos, donde la aceptación o rechazo es válida si la evaluación se realiza en forma objetiva. Un experimento, diseñado estadísticamente, proporciona una estimación del error el cual puede ser útil como norma para los otros resultados que deben ser medidos durante el experimento <sup>(36)</sup>.

## **2.21. POBLACIONES Y MUESTRAS.**

La aplicación de los métodos estadísticos requiere de la identificación y diferenciación entre población y muestra. Una población o universo se refiere a la colección finita o infinita de individuos o elementos, a los cuales se les debe contar o medir una o varias características. Los elementos poseen la información que busca el investigador y acerca del cual deben hacerse las inferencias. Entre los posibles elementos se considera a una sustancia, un compuesto, un mineral, etc y aunque existe la libertad de llamar población a un grupo cualquiera de elementos definidos en el tiempo y el espacio, en la práctica depende del contexto en el cual se les observa.

Una muestra es un subconjunto de elementos de la población que puede servir de base para generalizaciones válidas. En trabajos químicos, se toman muestras de un material, se ensayan y se hacen deducciones para la totalidad de dicho material, a partir de los resultados obtenidos. Una muestra no es exactamente una población, sino que se supone que la representa y la validez de cualquier conclusión obtenida depende de la verdadera representatividad que tenga. Así mismo, la muestra debe ser seleccionada en forma aleatoria, donde cada elemento tiene una probabilidad conocida y no nula de selección y por lo general, no es posible obtener una muestra aleatoria. Esto es especialmente cierto cuando el analista pueda confiar en su propio “juicio” o “conveniencia” al seleccionar los elementos de la muestra. El carácter aleatorio persigue que la muestra sea “representativa” de la población, para que concentre todas las características y particularidades de interés. Sin embargo, este factor no garantiza necesariamente la representatividad de la muestra respecto de la población, debido a que existen otros parámetros como el costo, el tiempo de análisis ó la imposibilidad práctica del método, los que determinan la selección de las muestras. El tamaño de la muestra,

por su parte, queda determinado por la variabilidad de la población, el nivel de confianza y el error máximo permisible. Cuando entre los elementos de una población existe un cierto grado de heterogeneidad, el tamaño de la muestra tiende a ser grande y es erróneo asegurar que la muestra depende del tamaño de la población.

Una investigación con todos los elementos de la población, se llama censo o enumeración total; mientras que cuando se elabora en base a una muestra, se le denomina estudio por muestreo. Para la mayoría de las investigaciones realizadas por los químicos, es preferible considerar los datos de enumeración total (o censo) o los datos muestrales.

## **2.22. EXACTITUD Y PRECISIÓN.**

La diferencia entre el resultado obtenido, en base al análisis de muestras y el “verdadero”, se toma como medida de la **exactitud** de la técnica estudiada. La **precisión** representa la probabilidad de que los resultados sucesivos caigan dentro un intervalo estrecho de valores, centrados alrededor del valor medio. Dependiendo del método de estudio, este puede diferir apreciablemente del valor “verdadero”; es decir puede existir una desviación, positiva o negativa. Un método satisfactorio de análisis debe poseer a la vez una exactitud y una precisión razonables y es fundamental que los químicos distingan cuidadosamente estos dos conceptos. Todos los instrumentos de alta tecnología que se emplean actualmente están contruidos para funcionar con un alto grado de precisión. Así, si se somete repetidamente la misma muestra a un instrumento determinado, las lecturas tienden a ser iguales cada vez. Estadísticamente, la precisión es un concepto que expresa el grado de dispersión de las estimaciones con respecto a su

valor medio y es medido como la raíz cuadrada de la varianza del estimador, el cual será más preciso cuanto menor sea su varianza <sup>(37)</sup>.

### **2.23. MEDIA ARITMETICA.**

La media de una muestra, se refiere a la suma de los valores observados y dividido entre el número total de elementos. Es la medida de mayor uso de la centralidad de un conjunto de datos. Si las observaciones en una muestra de tamaño  $n$  son  $x_1, \dots, x_n$  la media es el valor que se escribe de las siguientes formas equivalentes:

$$x = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$$

La media de una población de  $N$  elementos se calcula de la misma forma, solamente que la suma de los valores se dividen entre el tamaño de la población. La principal debilidad de este parámetro estadístico es su susceptibilidad a valores extremos, ya que todas las observaciones intervienen en el cálculo de la media. Cuando al promediar estos datos, los resultados se vuelven dudosos respecto a su tendencia central, se debe utilizar otras medidas de posición <sup>(38)</sup>.

### **2.24. DESVIACION ESTANDAR ( $\sigma$ ) Y VARIANZA ( $\sigma^2$ ).**

La varianza es una medida del grado de dispersión de los valores de una distribución alrededor del valor medio. Se define como la suma de los cuadrados de la diferencia entre los valores que consideran la variable aleatoria y la media de la distribución. El conocimiento del investigador, según el problema motivo de estudio, será útil al analizar la varianza. El denominador  $(n-1)$ , identificado

como grado de libertad, indica que solamente hay  $n-1$  desviaciones independientes de la media. El denominador aparece, porque se desea utilizar la varianza muestral  $s^2$  como un estimador no desviado de la varianza poblacional  $\sigma^2$ . La desviación estándar de un conjunto de datos, representa la variabilidad de los datos muestrales. Para obtener la desviación estándar se toma la raíz cuadrada de la varianza<sup>(39)</sup>.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

## 2.25. COEFICIENTE DE VARIACION.

Este parámetro es una medida de variabilidad relativa, tal que expresa la magnitud de la desviación estándar como un porcentaje de la media aritmética y es expresada como porcentaje. La fórmula de cálculo es:

$$CV(\%) = \frac{\sigma}{x} \times 100$$

El coeficiente de variación se utiliza para comparar variabilidad, entre dos o más variables, medidas en diferentes unidades o cuando su media es muy diferente. Así mismo, sólo se debe calcular para variables con todos los valores positivos y las observaciones pueden ser positivas o nulas, pero su variabilidad debe ser siempre positiva<sup>(40)</sup>.



## **2.26- PRUEBA DE HIPOTESIS.**

En cualquier investigación, implica la existencia de dos teorías o hipótesis implícitas, denominadas hipótesis nula e hipótesis alternativa, que de alguna manera reflejarán la idea, a priori, que se tiene y que es contrastada con la “realidad”.

Así mismo, aparecen diferentes tipos de errores que, generalmente, se cometen durante el desarrollo del procedimiento. No puede olvidarse que, habitualmente, el estudio y las conclusiones obtenidas para una población cualquiera, se habrán apoyado exclusivamente en el análisis de sólo una parte de la población. De la probabilidad con la que, regularmente, se comenten los errores, dependerá el tamaño de la muestra requerida.

## **2.27. METODO DE PRUEBAS DE HIPOTESIS.**

De manera general, la prueba de significancia contempla las siguientes etapas:

## **2.28. FORMULACION DE LAS HIPOTESIS.**

**Hipotesis nula:** Tiene un carácter negativo y escéptico, reta al investigador a demostrar que el enunciado es erróneo. Cuando no es rechazada la hipótesis nula implica que no existe suficiente información estadística que la refute. En tanto, el rechazo de la hipótesis nula implicará la aceptación de la hipótesis alternativa. En general, la hipótesis nula se formula de manera que su rechazo lleva a la aceptación de la conclusión deseada.

**Hipótesis Alternativa:** Es la afirmación planteada por el investigador y establece que el parámetro poblacional tiene un valor diferente, al establecido en la hipótesis nula <sup>(41)</sup>.

### **3. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO.**

#### **3.1. REACTIVOS**

- Estándar de Heptadecanoato de Metilo (neto), (100 mg) Marca RESTEK.
- Estándar de Mezcla de ésteres metílicos F.A.M.E. Mix C4-C24 (neto), (100 mg) Marca SUPELCO.
- Solvente Heptano, Grado GC, Marca FLUKA.

#### **3.2. MATERIALES**

- Fiolas de 10 mL, clase A.
- Micropipetas de 10 - 100 µL y 100 – 1000 µL.
- Viales ámbar de 10 mL de capacidad, con tapa rosca y septa de Politetrafluoretileno (PTFE).
- Viales para cromatografía de gases de 1.5 mL, con septa de PTFE.
- Balanza Analítica con precisión de 0.1 mg.
- Balón de Helio (Grado UHP).
- Balón de Hidrógeno, (Grado UHP).
- Balón de Aire Sintético, (Grado UHP).
- Columna cromatográfica Rt-2560 Columna Capilar 100 m x 0.25 mmID x 0.25 µm, Marca: RESTEK.

### **3.3. CARACTERISTICAS DEL CROMATOGRAFO DE GASES CON DETECTOR FID**

Marca : SHIMADZU

Modelo : GC-2010

Nº de serie : C11324508043 SA

- Puerto de Inyección en modo Split.
- Regulador de Flujo electrónico para gas de arrastre (Advanced Flow Controller).
- Regulador de Flujo electrónico para los gases del detector (Advanced Pressure Controller).
- Regulador para cilindros de gases (3) (H<sub>2</sub>, He y Aire Sintético).
- Detector de ionización de flama (FID).
- Computadora compatible con software de control.
- Software de control con PC GCSolution.

### **3.4. PUESTA EN OPERACIÓN DEL CROMATOGRAFO.**

Una buena resolución y reproducibilidad de resultados, es posible cuando se tiene en cuenta algunas medidas previas; sobre todo en el encendido del equipo.

#### **3.4.1. Precauciones importantes antes del encendido.**

- ✚ Se marca el valor adecuado para la presión de salida, a partir de los balones de Helio, Hidrógeno y Aire sintético.
- ✚ Se debe verificar posibles fugas en las líneas que transportan los gases, desde el balón hasta el cromatógrafo de gases.

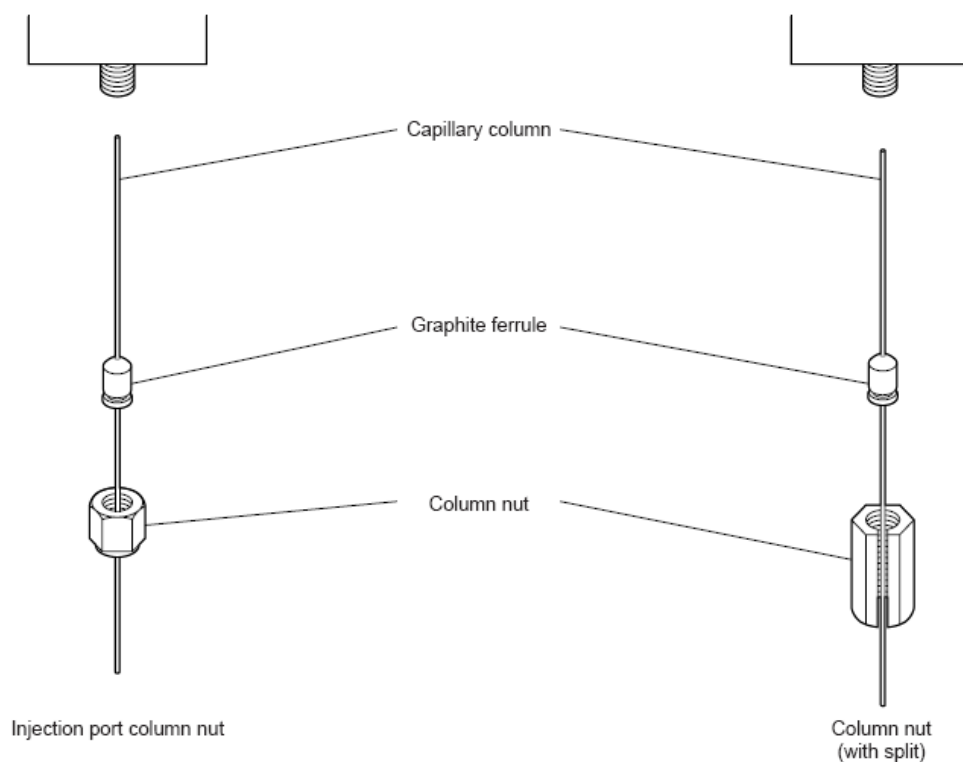
- ✚ Se debe verificar el estado del septum del puerto de inyección. Es necesario realizar el cambio cada 100 inyecciones.
- ✚ Se debe verificar el estado de la cámara de vaporización o Liner. Debe ser de vidrio deactivado con dimetil dicloro silano (DMDCS). Así mismo, se verificará el estado de la lana de sílica deactivada. Caso contrario, se corre el riesgo de trasladar impurezas durante el análisis.
- ✚ Se debe tener en cuenta que el hidrógeno es un gas muy peligroso, debido a que combustiona muy rápidamente.

#### **3.4.2. Encendido del Equipo.**

- ✚ La llave principal, que permite el paso de gas de arrastre, se debe encontrar abierta y el manómetro de salida debe marcar 80 Psi; o su equivalente en unidades de presión.
- ✚ Las llaves principales, que permiten el paso de los gases hidrógeno y aire sintético, deben marcar 60 Psi, o su equivalente en unidades de presión.
- ✚ Se debe verificar que, durante la instalación de la columna capilar, las férulas y “nuts” estén adecuadamente conectadas al cromatógrafo de gases y así evitar fugas de gas de arrastre.

Close-up ① (injection port side)

Close-up ② (detector side)



**Figura No 19:** Instalación de una columna cromatográfica mostrando las férrulas y los nuts

- ✚ Se debe verificar el estado de la jeringa a usar para la inyección de la muestra.

Luego de cumplir con todos estos requisitos, el encendido del sistema procede de la siguiente forma:

- ✚ El cromatógrafo GC-2010 se enciende presionando el switch de encendido; que se encuentra en el lado inferior derecho del instrumento.
- ✚ Se espera que los indicadores LED, ubicados en la parte superior del panel del cromatógrafo, dejen de centellear y estén encendidos permanentemente.

Finalmente, se enciende la PC y cuando termine de cargar se hace doble clic al icono del software GCSolution. Posteriormente se hace clic en el icono de un cromatógrafo y se espera que el software se enlace al instrumento; apareciendo

inmediatamente la ventana “GC Real Time Análisis”, momento en el cual el instrumento está apto para iniciar el trabajo.



**Figura No 20:** Cromatógrafo de Gases con Detector de Ionización por Flama FID.

## **4. DESARROLLO EXPERIMENTAL.**

El desarrollo de una nueva forma de cuantificación de ésteres metílicos de ácidos grasos, considera la preparación y adecuación del estándar y de la muestra; seguido de su cuantificación y verificación de resultados.

### **4.1. PREPARACION DEL MATERIAL VOLUMETRICO**

El material de vidrio empleado en el trabajo experimental debe ser cuidadosamente lavado, con detergente neutro, y enjuagado con abundante agua. Luego, se enjuaga con heptano por tres veces, para remover posibles interferencias de naturaleza orgánica. Es así como se consigue que el material a usar esté libre de solventes y de cualquier otra impureza.

### **4.2. PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES**

Los estándares que se requerirán para el desarrollo del trabajo propuesto, son soluciones que contienen 10 mg de soluto por mililitro de solución (10 mg/mL). La solución del estándar de la mezcla de ésteres metílicos de ácido graso (FAME), fue preparada a partir de una ampolla conteniendo la mezcla de 37 ésteres metílicos de ácidos grasos. La solución del estándar interno, heptadecanoato de metilo, fue preparada a partir del compuesto puro. En ambos casos no hubo tratamiento adicional.

- Para preparar la primera solución se rompe la ampolla del estándar neto de 37 componentes FAME y se trasvasa, cuidadosamente, el contenido a una fiola de 10 mL. Se enrasa con heptano de grado GC y se agita vigorosamente hasta formar una mezcla homogénea. Luego ésta es trasvasada a un vial ámbar de 10 mL, procediendo a refrigerarla.

- La solución del segundo estándar, se obtiene al trasvasar el heptadecanoato de metilo; contenido en una ampolla, a una fiola de 10 mL. Ésta también es enrasada con heptano de grado GC, agitándolo vigorosamente hasta formar una solución. Así mismo, se transvasa a un vial ámbar de 10 mL y se refrigera.

#### **4.3. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.**

La muestra es el producto final de la producción de biodiesel, obtenido a partir de aceite de palma e identificado como B100. Aquí también fueron preparadas dos muestras: una para aplicar la norma EN-14103 y la otra para la cuantificación que se propone.

- Para la norma EN-14103, se pesa aproximadamente 250 mg de muestra en un vial ámbar de 10 mL y se añade 5 mL de la solución de estándar interno de heptadecanoato de metilo.
- Para la cuantificación propuesta; se pesa aproximadamente 150 mg de muestra en un vial ámbar de 10 mL, se añaden 10 mL de solvente heptano, grado GC, y se agita vigorosamente.

#### **4.4. ANALISIS SEMICUANTITATIVO DEL CONTENIDO DE ESTERES METILICOS DE ACIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFIA DE GASES**

Para la cuantificación del contenido de ésteres metílicos de ácido graso, usando la técnica instrumental de cromatografía de gases, se utilizaron los siguientes parámetros cromatográficos:



Puerto de Inyección	Horno de Columna	Detector
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Temperatura:</b> 260 °C</li> <li>• <b>Modo de Inyección:</b> Split.</li> <li>• <b>Razón Split:</b> 1/50.</li> <li>• <b>Volumen de Inyección:</b> 1 µL.</li> <li>• <b>Modo de Control de Flujo:</b> Velocidad Lineal.</li> <li>• <b>Flujo de Columna:</b> 1.96 mL/min.</li> <li>• <b>Velocidad Lineal:</b> 20.0 cm/sec.</li> <li>• <b>Gas Carrier:</b> Helio.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Programación de Temperatura:</b> 140 °C x 5 min 240 °C a 4 °C/min x 15 min</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Temperatura:</b> 260 °C.</li> <li>• <b>Flujo de Hidrógeno:</b> 40 mL</li> <li>• <b>Flujo de Aire Sintético:</b> 400 mL.</li> </ul>

## METODOLOGIA

Se inyecta al cromatógrafo, 1 µL de solución estándar patrón de la mezcla de 37 FAME (10 mg/mL); obteniéndose el cromatograma con los 37 picos. Posteriormente se identifican cada uno de los 37 ésteres metílicos presentes, en función de sus tiempos de retención. Las concentraciones para cada componente, expresadas en miligramos, se encuentran en el certificado de análisis proporcionado por SUPELCO. Posteriormente se calcula los factores de respuesta del detector FID para cada éster metílico de ácido graso, presente en el estándar; relacionando la concentración mencionada previamente en el certificado de análisis, con las áreas obtenidas en el cromatograma de la solución estándar.

A las mismas condiciones cromatográficas que se obtuvo el cromatograma de la solución estándar, también obtendremos los cromatogramas de nuestras muestras, previamente preparadas. Se inyecta, al cromatógrafo, 1 µL de solución de muestra; detectando, el instrumento de manera automática, los ésteres metílicos de ácidos grasos presentes en la muestra y, el software nos provee los respectivos valores de área para cada pico cromatográfico.

#### 4.5. VERIFICACION DE LOS RESULTADOS SOBRE CONTENIDO DE ESTERES METILICOS DE ACIDOS GRASOS DE ACUERDO A LA NORMA EN-14103

Para la verificación de los resultados obtenidos en la experiencia anterior; se inyecta la misma muestra, aplicando las directivas referidas en la norma EN-14103, y utilizando los siguientes parámetros cromatográficos:

Puerto de Inyección	Horno de Columna	Detector
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Temperatura:</b> 260 °C</li> <li>• <b>Modo de Inyección:</b> Split.</li> <li>• <b>Razón Split:</b> 1/100.</li> <li>• <b>Volumen de Inyección:</b> 1 µL.</li> <li>• <b>Modo de Control de Flujo:</b> Velocidad Lineal.</li> <li>• <b>Flujo de Columna:</b> 1.96 mL/min.</li> <li>• <b>Velocidad Lineal:</b> 20.0 cm/sec.</li> <li>• <b>Gas Carrier:</b> Helio.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Programación de Temperatura:</b> 140 °C x 5 min 240 °C a 4 °C/min x 15 min</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Temperatura:</b> 260 °C.</li> <li>• <b>Flujo de Hidrógeno:</b> 40 mL</li> <li>• <b>Flujo de Aire Sintético:</b> 400 mL.</li> </ul>

## METODOLOGIA

Para poder identificar los tiempos de retención de los ésteres metílicos de ácidos grasos, se inyecta al cromatógrafo 1  $\mu\text{L}$  de solución estándar patrón de la mezcla de 37 FAME (10 mg/mL).

A las mismas condiciones cromatográficas y con los datos cuantitativos almacenados en el software, se inyecta al cromatógrafo 1  $\mu\text{L}$  de solución de muestra, previamente preparada. El software detecta, automáticamente, los ésteres metílicos de ácidos grasos presentes en la muestra y la cuantificación se hace de acuerdo a la norma EN 14103.

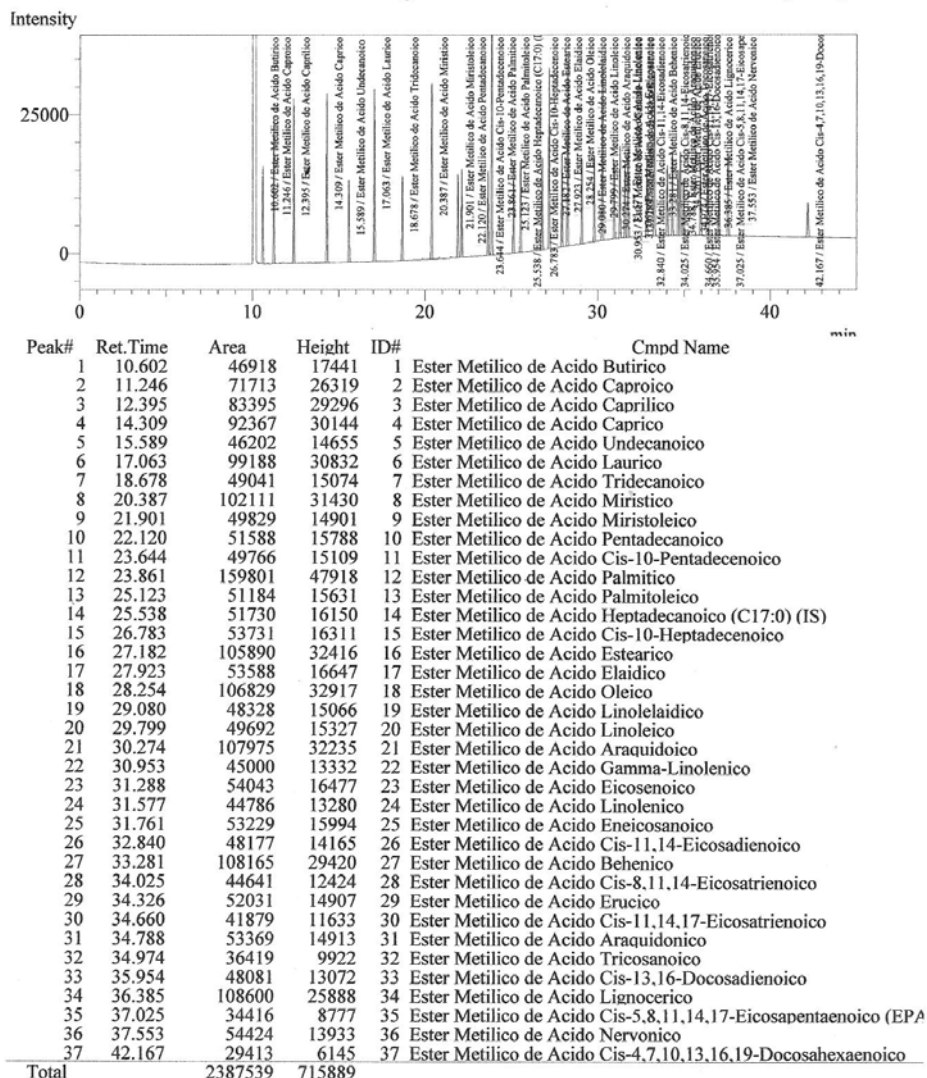
## 5. RESULTADOS OBTENIDOS.

**TABLA N°2 ESTANDAR MIX DE 37 COMPONENTES (LECTURA N°1)**

<b>Tiempo de Retención</b>	<b>Área</b>	<b>Altura</b>	<b>Contenido (mg)</b>	<b>Nombre</b>
10,602	46919	17441	4,01	Éster Metílico de Ácido Butírico
11,246	71713	26319	3,99	Éster Metílico de Ácido Caproico
12,395	83395	29296	3,99	Éster Metílico de Ácido Caprílico
14,309	92367	30144	4,03	Éster Metílico de Ácido Cáprico
15,589	46202	14655	1,99	Éster Metílico de Ácido Undecanoico
17,063	99188	30832	4,07	Éster Metílico de Ácido Láurico
18,678	49041	15074	1,99	Éster Metílico de Ácido Tridecanoico
20,387	102111	31430	3,99	Éster Metílico de Ácido Mirístico
21,901	49829	14901	1,98	Éster Metílico de Ácido Miristoleico
22,120	51588	15789	2,00	Éster Metílico de Ácido Pentadecanoico
23,644	49766	15109	1,98	Éster Metílico de Ácido Cis-10-Pentadecenoico
23,861	159801	47918	5,94	Éster Metílico de Ácido Palmítico
25,123	51185	15631	2,00	Éster Metílico de Ácido Palmitoleico
25,538	51730	16151	2,01	Éster Metílico de Ácido Heptadecanoico (C17:0) (IS)
26,783	53731	16311	2,02	Éster Metílico de Ácido Cis-10-Heptadecenoico
27,182	105890	32416	3,96	Éster Metílico de Ácido Estearico
27,923	53588	16647	2,06	Éster Metílico de Ácido Elaídico
28,254	106829	32917	3,98	Éster Metílico de Ácido Oleico
29,080	48328	15066	1,99	Éster Metílico de Ácido Linolelaídico
29,799	49692	15328	2,03	Éster Metílico de Ácido Linoleico
30,274	107975	32235	3,97	Éster Metílico de Ácido Araquidoico
30,953	45001	13332	2,02	Éster Metílico de Ácido Gamma-Linolénico
31,288	54043	16477	2,06	Éster Metílico de Ácido Eicosenoico
31,577	44786	13280	2,03	Éster Metílico de Ácido Linolénico
31,761	53229	15994	1,98	Éster Metílico de Ácido Eneicosanoico
32,840	48177	14165	1,99	Éster Metílico de Ácido Cis-11,14-Eicosadienoico
33,281	108165	29420	3,97	Éster Metílico de Ácido Behénico
34,025	44641	12424	2,06	Éster Metílico de Ácido Cis-8,11,14-Eicosatrienoico
34,326	52031	14907	1,99	Éster Metílico de Ácido Erúcico
34,660	41879	11633	2,06	Éster Metílico de Ácido Cis-11,14,17-Eicosatrienoico
34,788	53369	14913	1,99	Éster Metílico de Ácido Araquidónico
34,974	36419	9922	1,98	Éster Metílico de Ácido Tricosanoico
35,954	48081	13073	1,98	Éster Metílico de Ácido Cis-13,16-Docosadienoico
36,385	108600	25888	3,98	Éster Metílico de Ácido Lignocérico
37,025	34416	8777	2,00	Éster Metílico de Ácido Cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoico (EPA)
37,553	54424	13933	2,04	Éster Metílico de Ácido Nervónico
42,167	29413	6145	1,98	Éster Metílico de Ácido Cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoico

Analysis Date & Time : 09/11/2009 03:18:05 p.m.  
User Name : Admin  
Vial# : 1  
Sample Name : FAME Mix C4-C24:1 (10 mg/mL)  
Sample ID : FAME Mix  
Sample Type : Standard  
Injection Volume : 1.00  
ISTD Amount :

Data Name : G:\Tesis\Tesis Data\FAME Mix 1.gcd  
Method Name : C:\Documents and Settings\Administrador\Escritorio\FAMES Método Propuesto.gcm

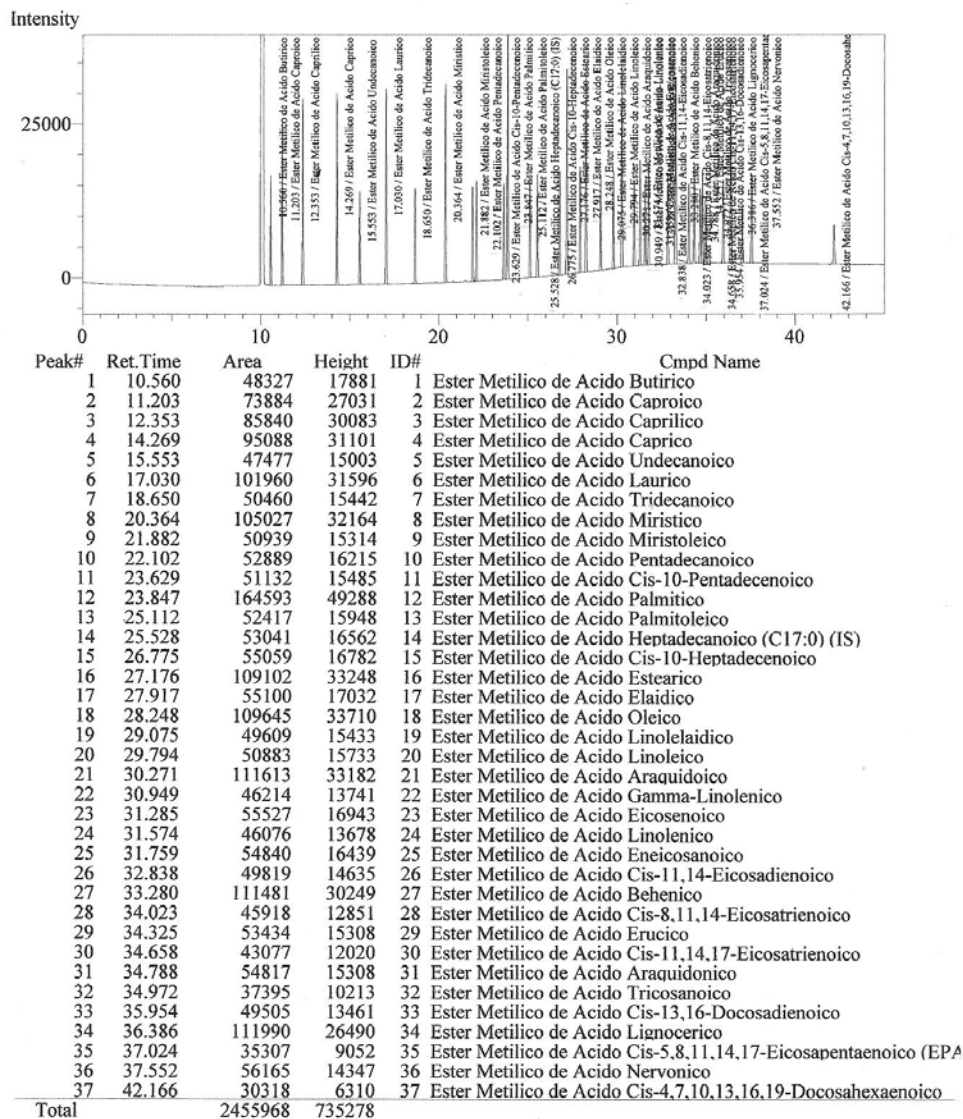


**TABLA N°3 ESTANDAR MIX DE 37 COMPONENTES (LECTURA N°2)**

<b>Tiempo de Retención</b>	<b>Área</b>	<b>Altura</b>	<b>Contenido (mg)</b>	<b>Nombre</b>
10,560	48327	17881	4,01	Éster Metílico de Ácido Butírico
11,203	73884	27031	3,99	Éster Metílico de Ácido Caproico
12,353	85840	30083	3,99	Éster Metílico de Ácido Caprílico
14,269	95088	31101	4,03	Éster Metílico de Ácido Cáprico
15,553	47478	15003	1,99	Éster Metílico de Ácido Undecanoico
17,030	101960	31596	4,07	Éster Metílico de Ácido Láurico
18,650	50460	15442	1,99	Éster Metílico de Ácido Tridecanoico
20,364	105027	32165	3,99	Éster Metílico de Ácido Mirístico
21,882	50939	15314	1,98	Éster Metílico de Ácido Miristoleico
22,102	52889	16215	2,00	Éster Metílico de Ácido Pentadecanoico
23,629	51132	15485	1,98	Éster Metílico de Ácido Cis-10-Pentadecenoico
23,847	164593	49288	5,94	Éster Metílico de Ácido Palmítico
25,112	52417	15948	2,00	Éster Metílico de Ácido Palmitoleico
25,528	53041	16562	2,01	Éster Metílico de Ácido Heptadecanoico (C17:0) (IS)
26,775	55059	16782	2,02	Éster Metílico de Ácido Cis-10-Heptadecenoico
27,176	109102	33248	3,96	Éster Metílico de Ácido Esteárico
27,917	55100	17032	2,06	Éster Metílico de Ácido Elaídico
28,248	109645	33710	3,98	Éster Metílico de Ácido Oleico
29,075	49609	15433	1,99	Éster Metílico de Ácido Linolelaídico
29,794	50883	15733	2,03	Éster Metílico de Ácido Linoleico
30,271	111613	33182	3,97	Éster Metílico de Ácido Araquidoico
30,949	46214	13741	2,02	Éster Metílico de Ácido Gamma-Linolénico
31,285	55527	16943	2,06	Éster Metílico de Ácido Eicosenoico
31,574	46076	13678	2,03	Éster Metílico de Ácido Linolénico
31,759	54840	16439	1,98	Éster Metílico de Ácido Eneicosanoico
32,838	49819	14635	1,99	Éster Metílico de Ácido Cis-11,14-Eicosadienoico
33,280	111481	30250	3,97	Éster Metílico de Ácido Behénico
34,023	45918	12851	2,06	Éster Metílico de Ácido Cis-8,11,14-Eicosatrienoico
34,325	53434	15308	1,99	Éster Metílico de Ácido Erúcico
34,658	43077	12020	2,06	Éster Metílico de Ácido Cis-11,14,17-Eicosatrienoico
34,788	54817	15308	1,99	Éster Metílico de Ácido Araquidónico
34,972	37396	10213	1,98	Éster Metílico de Ácido Tricosanoico
35,954	49505	13461	1,98	Éster Metílico de Ácido Cis-13,16-Docosadienoico
36,386	111990	26490	3,98	Éster Metílico de Ácido Lignocérico
37,024	35307	9052	2,00	Éster Metílico de Ácido Cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoico (EPA)
37,552	56165	14347	2,04	Éster Metílico de Ácido Nervónico
42,166	30318	6310	1,98	Éster Metílico de Ácido Cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoico

Analysis Date & Time : 09/11/2009 04:06:25 p.m.  
 User Name : Admin  
 Vial# : 1  
 Sample Name : FAME Mix C4-C24:1 (10 mg/mL)  
 Sample ID : FAME Mix  
 Sample Type : Standard  
 Injection Volume : 1.00  
 ISTD Amount :

Data Name : G:\Tesis\Tesis Data\FAME Mix 2.gcd  
 Method Name : C:\Documents and Settings\Administrador\Escritorio\FAMES Método Propuesto.gcm



**TABLA N°4 ESTANDAR MIX DE 37 COMPONENTES (LECTURA N°3)**

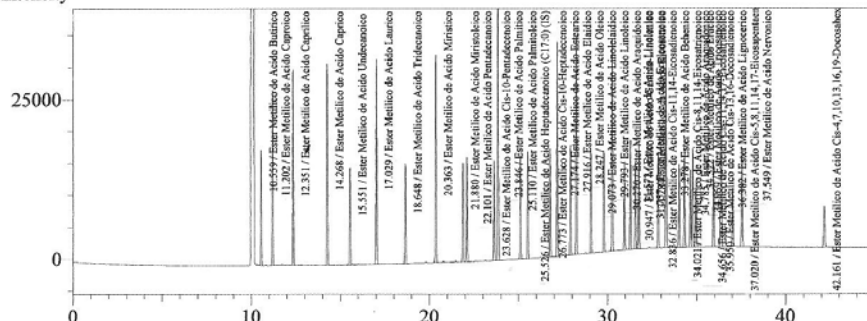
<b>Tiempo de Retención</b>	<b>Área</b>	<b>Altura</b>	<b>Contenido (mg)</b>	<b>Nombre</b>
10,559	48507	18024	4,01	Éster Metílico de Ácido Butírico
11,202	74687	27299	3,99	Éster Metílico de Ácido Caproico
12,351	86568	30483	3,99	Éster Metílico de Ácido Caprílico
14,268	95993	31338	4,03	Éster Metílico de Ácido Cáprico
15,551	47907	15108	1,99	Éster Metílico de Ácido Undecanoico
17,029	102706	31837	4,07	Éster Metílico de Ácido Láurico
18,648	50889	15547	1,99	Éster Metílico de Ácido Tridecanoico
20,363	105684	32387	3,99	Éster Metílico de Ácido Mirístico
21,880	51522	15461	1,98	Éster Metílico de Ácido Miristoleico
22,101	53264	16342	2,00	Éster Metílico de Ácido Pentadecanoico
23,628	51435	15530	1,98	Éster Metílico de Ácido Cis-10-Pentadecenoico
23,846	165319	49778	5,94	Éster Metílico de Ácido Palmítico
25,110	52772	16119	2,00	Éster Metílico de Ácido Palmitoleico
25,526	53247	16652	2,01	Éster Metílico de Ácido Heptadecanoico (C17:0) (IS)
26,773	55209	16799	2,02	Éster Metílico de Ácido Cis-10-Heptadecenoico
27,174	109336	33300	3,96	Éster Metílico de Ácido Esteárico
27,916	55211	17127	2,06	Éster Metílico de Ácido Elaídico
28,247	110092	33965	3,98	Éster Metílico de Ácido Oleico
29,073	49746	15516	1,99	Éster Metílico de Ácido Linolelaídico
29,793	51034	15682	2,03	Éster Metílico de Ácido Linoleico
30,270	111463	33069	3,97	Éster Metílico de Ácido Araquidoico
30,947	46435	13770	2,02	Éster Metílico de Ácido Gamma-Linolénico
31,284	55744	17027	2,06	Éster Metílico de Ácido Eicosenoico
31,572	46090	13686	2,03	Éster Metílico de Ácido Linolénico
31,757	54768	16433	1,98	Éster Metílico de Ácido Eneicosanoico
32,836	49922	14628	1,99	Éster Metílico de Ácido Cis-11,14-Eicosadienoico
33,278	111605	30209	3,97	Éster Metílico de Ácido Behénico
34,021	46254	12869	2,06	Éster Metílico de Ácido Cis-8,11,14-Eicosatrienoico
34,322	53720	15372	1,99	Éster Metílico de Ácido Erúcico
34,656	43440	11998	2,06	Éster Metílico de Ácido Cis-11,14,17-Eicosatrienoico
34,785	54728	15253	1,99	Éster Metílico de Ácido Araquidónico
34,969	37532	10250	1,98	Éster Metílico de Ácido Tricosanoico
35,950	49422	13506	1,98	Éster Metílico de Ácido Cis-13,16-Docosadienoico
36,382	112014	26561	3,98	Éster Metílico de Ácido Lignocérico
37,020	35499	9065	2,00	Éster Metílico de Ácido Cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoico (EPA)
37,549	56155	14321	2,04	Éster Metílico de Ácido Nervónico
42,161	30575	6355	1,98	Éster Metílico de Ácido Cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoico



Analysis Date & Time : 09/11/2009 04:54:44 p.m.  
 User Name : Admin  
 Vial# : 1  
 Sample Name : FAME Mix C4-C24:1 (10 mg/mL)  
 Sample ID : FAME Mix  
 Sample Type : Standard  
 Injection Volume : 1.00  
 ISTD Amount :

Data Name : G:\Tesis\Tesis Data\FAME Mix 3.gcd  
 Method Name : C:\Documents and Settings\Administrador\Escritorio\FAMES Método Propuesto.gcm

Intensity



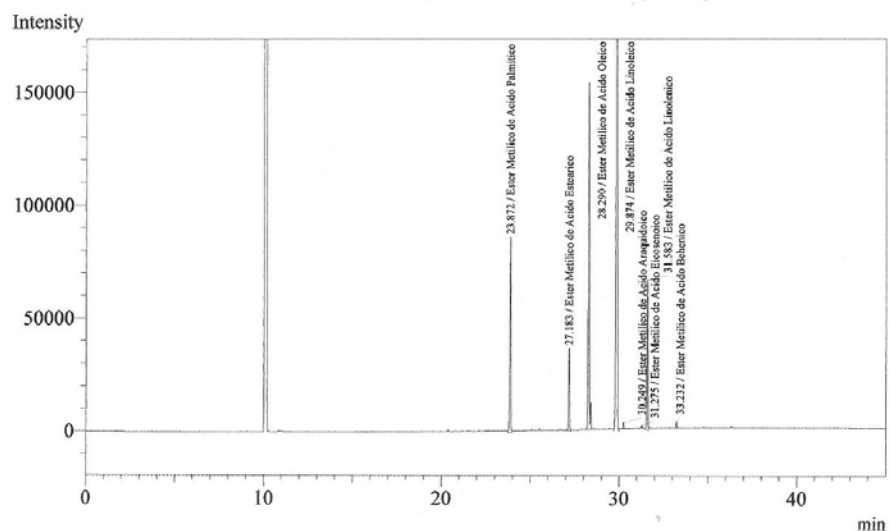
Peak#	Ret.Time	Area	Height	ID#	Cmpd Name
1	10.559	48507	18023	1	Ester Metilico de Acido Butirico
2	11.202	74687	27299	2	Ester Metilico de Acido Caproico
3	12.351	86568	30483	3	Ester Metilico de Acido Caprilico
4	14.268	95993	31338	4	Ester Metilico de Acido Caprico
5	15.551	47907	15108	5	Ester Metilico de Acido Undecanoico
6	17.029	102706	31837	6	Ester Metilico de Acido Laurico
7	18.648	50889	15547	7	Ester Metilico de Acido Tridecanoico
8	20.363	105684	32387	8	Ester Metilico de Acido Miristico
9	21.880	51522	15461	9	Ester Metilico de Acido Miristoleico
10	22.101	53264	16342	10	Ester Metilico de Acido Pentadecanoico
11	23.628	51435	15530	11	Ester Metilico de Acido Cis-10-Pentadecenoico
12	23.846	165319	49778	12	Ester Metilico de Acido Palmitico
13	25.110	52772	16119	13	Ester Metilico de Acido Palmitoleico
14	25.526	53247	16652	14	Ester Metilico de Acido Heptadecanoico (C17:0) (IS)
15	26.773	55209	16799	15	Ester Metilico de Acido Cis-10-Heptadecenoico
16	27.174	109336	33300	16	Ester Metilico de Acido Estearico
17	27.916	55211	17127	17	Ester Metilico de Acido Elaidico
18	28.247	110091	33965	18	Ester Metilico de Acido Oleico
19	29.073	49746	15516	19	Ester Metilico de Acido Linoleaidico
20	29.793	51034	15682	20	Ester Metilico de Acido Linoleico
21	30.270	111463	33069	21	Ester Metilico de Acido Araquidoico
22	30.947	46435	13770	22	Ester Metilico de Acido Gamma-Linolenico
23	31.284	55744	17027	23	Ester Metilico de Acido Eicosenoico
24	31.572	46090	13685	24	Ester Metilico de Acido Linolenico
25	31.757	54768	16433	25	Ester Metilico de Acido Eneicosanoico
26	32.836	49921	14628	26	Ester Metilico de Acido Cis-11,14-Eicosadienoico
27	33.278	111605	30209	27	Ester Metilico de Acido Behenico
28	34.021	46254	12869	28	Ester Metilico de Acido Cis-8,11,14-Eicosatrienoico
29	34.322	53720	15372	29	Ester Metilico de Acido Erucico
30	34.656	43440	11998	30	Ester Metilico de Acido Cis-11,14,17-Eicosatrienoico
31	34.785	54728	15253	31	Ester Metilico de Acido Araquidonico
32	34.969	37532	10250	32	Ester Metilico de Acido Tricosanoico
33	35.950	49422	13506	33	Ester Metilico de Acido Cis-13,16-Docosadienoico
34	36.382	112014	26561	34	Ester Metilico de Acido Lignocericico
35	37.020	35499	9065	35	Ester Metilico de Acido Cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoico (EPA)
36	37.549	56155	14321	36	Ester Metilico de Acido Nervonico
37	42.161	30574	6355	37	Ester Metilico de Acido Cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoico
Total		2466491	738664		

**TABLA Nº5 ANALISIS SEMICUANTITATIVO DE ESTERES METILICOS DE  
ACIDO GRASO EN MUESTRA DE BIODIESEL OBTENIDO A PARTIR DE  
ACEITE DE PALMA (LECTURA Nº1) (ANALISTA Nº1)**

<b>Tiempo de Retención</b>	<b>Área</b>	<b>Altura</b>	<b>Contenido en la muestra (mg)</b>	<b>Nombre</b>
23,872	311076	86194	11,3	Éster Metílico de Ácido Palmítico
27,183	127108	36344	4,7	Éster Metílico de Ácido Esteárico
28,290	643731	152516	23,5	Éster Metílico de Ácido Oleico
29,874	1645325	349982	66,1	Éster Metílico de Ácido Linoleico
30,249	8901	2874	0,3	Éster Metílico de Ácido Araquidoico
31,275	3908	1327	0,1	Éster Metílico de Ácido Eicosenoico
31,583	230567	65998	10,3	Éster Metílico de Ácido Linolénico
33,232	9329	2848	0,3	Éster Metílico de Ácido Behénico

Analysis Date & Time : 10/11/2009 10:21:10 a.m.  
 User Name : Admin  
 Vial# : 1  
 Sample Name : Muestra Biodiesel  
 Sample ID : B100  
 Sample Type : Unknown  
 Injection Volume : 1.00  
 ISTD Amount :

Data Name : G:\Tesis\Tesis Data\F.A.M.E. Nuevo 1.gcd  
 Method Name : C:\WINDOWS\Data\Project1\FAMES Método Propuesto.gcm



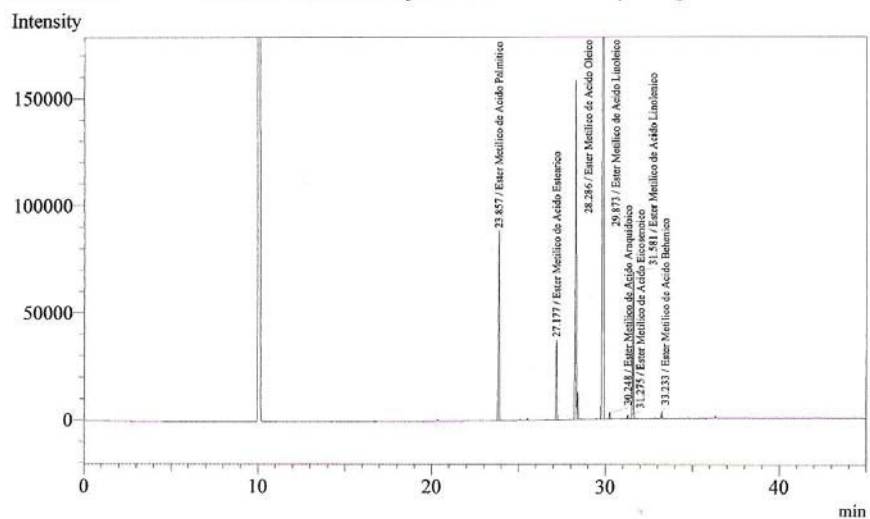
Peak#	Ret.Time	Area	Height	ID#	Cmpd Name
1	23.872	311076	86194	12	Ester Metilico de Acido Palmítico
2	27.183	127108	36344	16	Ester Metilico de Acido Estearico
3	28.290	643731	152516	18	Ester Metilico de Acido Oleico
4	29.874	1645325	349982	20	Ester Metilico de Acido Linoleico
5	30.249	8901	2874	21	Ester Metilico de Acido Araquidoico
6	31.275	3908	1327	23	Ester Metilico de Acido Eicosenoico
7	31.583	230567	65998	24	Ester Metilico de Acido Linolenico
8	33.232	9329	2848	27	Ester Metilico de Acido Behenico
Total		2979945	698083		

**TABLA N°6 ANALISIS SEMICUANTITATIVO DE ESTERES METILICOS DE  
ACIDO GRASO EN MUESTRA DE BIODIESEL OBTENIDO A PARTIR DE  
ACEITE DE PALMA (LECTURA N°2) (ANALISTA N°1)**

<b>Tiempo de Retención</b>	<b>Área</b>	<b>Altura</b>	<b>Contenido en la muestra (mg)</b>	<b>Nombre</b>
23,857	312778	87838	11,4	Éster Metílico de Ácido Palmítico
27,177	127607	37160	4,7	Éster Metílico de Ácido Esteárico
28,286	631954	157687	23,1	Éster Metílico de Ácido Oleico
29,873	1678295	356717	67,4	Éster Metílico de Ácido Linoleico
30,248	9408	3014	0,3	Éster Metílico de Ácido Araquidoico
31,275	4315	1413	0,2	Éster Metílico de Ácido Eicosenoico
31,581	231348	67793	10,3	Éster Metílico de Ácido Linolénico
33,233	9824	3000	0,4	Éster Metílico de Ácido Behénico

Analysis Date & Time : 10/11/2009 11:09:32 a.m.  
 User Name : Admin  
 Vial# : 1  
 Sample Name : Muestra Biodiesel  
 Sample ID : B100  
 Sample Type : Unknown  
 Injection Volume : 1.00  
 ISTD Amount :

Data Name : G:\Tesis\Tesis Data\F.A.M.E. Nuevo 2.gcd  
 Method Name : C:\WINDOWS\Data\Project1\FAMES Método Propuesto.gcm



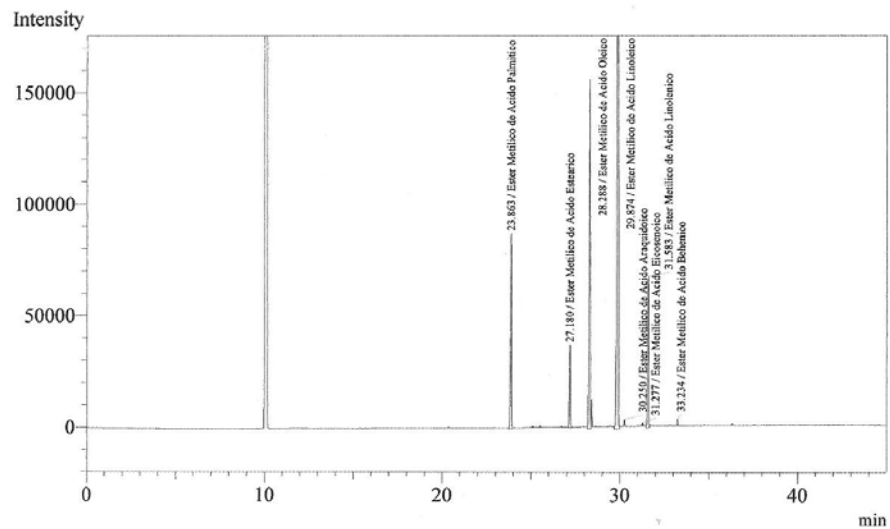
Peak#	Ret.Time	Area	Height	ID#	Cmpd Name
1	23.857	312778	87838	12	Ester Metilico de Acido Palmítico
2	27.177	127607	37160	16	Ester Metilico de Acido Estearico
3	28.286	631954	157687	18	Ester Metilico de Acido Oleico
4	29.873	1678295	356717	20	Ester Metilico de Acido Linoleico
5	30.248	9408	3014	21	Ester Metilico de Acido Araquidoico
6	31.275	4315	1413	23	Ester Metilico de Acido Eicosenoico
7	31.581	231348	67793	24	Ester Metilico de Acido Linolenico
8	33.233	9824	3000	27	Ester Metilico de Acido Behenico
Total		3005529	714622		

**TABLA N°7 ANALISIS SEMICUANTITATIVO DE ESTERES METILICOS DE  
ACIDO GRASO EN MUESTRA DE BIODIESEL OBTENIDO A PARTIR DE  
ACEITE DE PALMA (LECTURA N°3) (ANALISTA N°1)**

<b>Tiempo de Retención</b>	<b>Área</b>	<b>Altura</b>	<b>Contenido en la muestra (mg)</b>	<b>Nombre</b>
23,863	313027	87347	11,4	Éster Metílico de Ácido Palmítico
27,180	129464	36806	4,7	Éster Metílico de Ácido Esteárico
28,288	628175	156224	23,0	Éster Metílico de Ácido Oleico
29,874	1664726	353892	66,9	Éster Metílico de Ácido Linoleico
30,250	9022	2900	0,3	Éster Metílico de Ácido Araquidoico
31,277	4093	1359	0,2	Éster Metílico de Ácido Eicosenoico
31,583	235890	67283	10,5	Éster Metílico de Ácido Linolénico
33,234	9657	2917	0,3	Éster Metílico de Ácido Behénico

Analysis Date & Time : 10/11/2009 11:58:26 a.m.  
 User Name : Admin  
 Vial# : 1  
 Sample Name : Muestra Biodiesel  
 Sample ID : B100  
 Sample Type : Unknown  
 Injection Volume : 1.00  
 ISTD Amount :

Data Name : G:\Tesis\Tesis Data\F.A.M.E. Nuevo 3.gcd  
 Method Name : C:\WINDOWS\Data\Project1\FAMES Método Propuesto.gcm



Peak#	Ret.Time	Area	Height	ID#	Cmpd Name
1	23.863	313027	87347	12	Ester Metilico de Acido Palmítico
2	27.180	129464	36806	16	Ester Metilico de Acido Estearico
3	28.288	628175	156224	18	Ester Metilico de Acido Oleico
4	29.874	1664726	353892	20	Ester Metilico de Acido Linoleico
5	30.250	9022	2900	21	Ester Metilico de Acido Araquidoico
6	31.277	4093	1359	23	Ester Metilico de Acido Eicosenoico
7	31.583	235890	67283	24	Ester Metilico de Acido Linolenico
8	33.234	9657	2917	27	Ester Metilico de Acido Behenico
Total		2994054	708728		

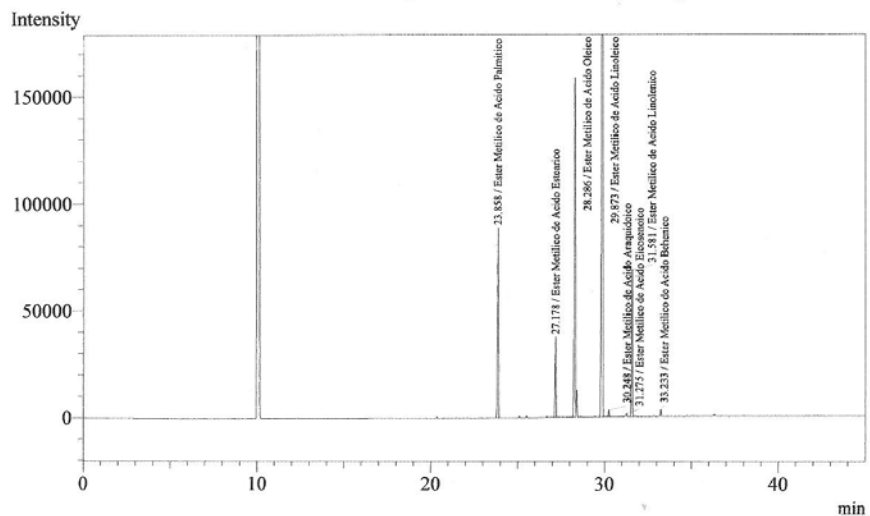
**TABLA N°8 ANALISIS SEMICUANTITATIVO DE ESTERES METILICOS DE  
ACIDO GRASO EN MUESTRA DE BIODIESEL OBTENIDO A PARTIR DE  
ACEITE DE PALMA (LECTURA N°4) (ANALISTA N°1)**

<b>Tiempo de Retención</b>	<b>Área</b>	<b>Altura</b>	<b>Contenido en la muestra (mg)</b>	<b>Nombre</b>
23,858	313986	88535	11,4	Éster Metílico de Ácido Palmítico
27,178	128273	37318	4,7	Éster Metílico de Ácido Esteárico
28,286	633907	158131	23,2	Éster Metílico de Ácido Oleico
29,873	1686502	358547	67,7	Éster Metílico de Ácido Linoleico
30,248	9189	3004	0,3	Éster Metílico de Ácido Araquidoico
31,275	4281	1412	0,2	Éster Metílico de Ácido Eicosenoico
31,581	232536	68188	10,3	Éster Metílico de Ácido Linolénico
33,233	9807	2989	0,4	Éster Metílico de Ácido Behénico



Analysis Date & Time : 10/11/2009 12:46:46 p.m.  
 User Name : Admin  
 Vial# : 1  
 Sample Name : Muestra Biodiesel  
 Sample ID : B100  
 Sample Type : Unknown  
 Injection Volume : 1.00  
 ISTD Amount :

Data Name : G:\Tesis\Tesis Data\F.A.M.E. Nuevo 4.gcd  
 Method Name : C:\WINDOWS\Data\Project1\FAMES Método Propuesto.gcm



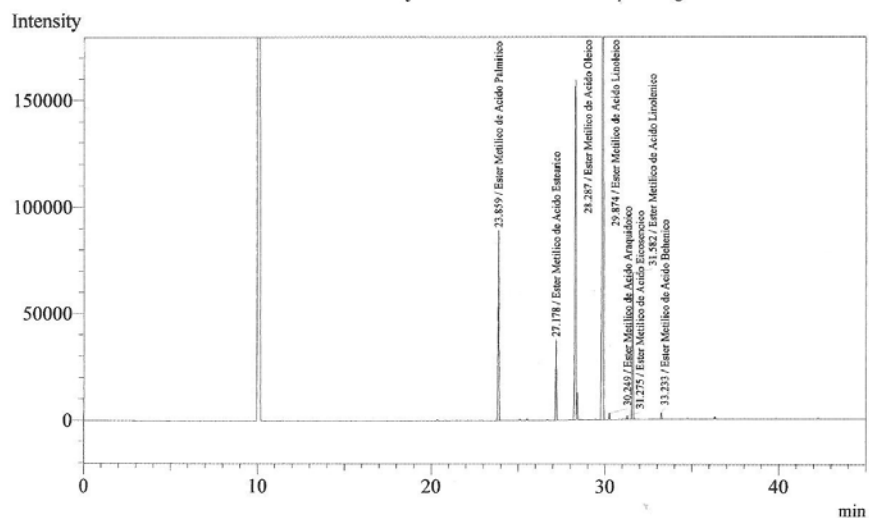
Peak#	Ret. Time	Area	Height	ID#	Cmpd Name
1	23.858	313986	88535	12	Ester Metilico de Acido Palmítico
2	27.178	128273	37318	16	Ester Metilico de Acido Estearico
3	28.286	633907	158131	18	Ester Metilico de Acido Oleico
4	29.873	1686502	358547	20	Ester Metilico de Acido Linoleico
5	30.248	9189	3004	21	Ester Metilico de Acido Araquidoico
6	31.275	4281	1412	23	Ester Metilico de Acido Eicosenoico
7	31.581	232536	68188	24	Ester Metilico de Acido Linolenico
8	33.233	9807	2989	27	Ester Metilico de Acido Behenico
Total		3018481	718124		

**TABLA N°9 ANALISIS SEMICUANTITATIVO DE ESTERES METILICOS DE  
ACIDO GRASO EN MUESTRA DE BIODIESEL OBTENIDO A PARTIR DE  
ACEITE DE PALMA (LECTURA N°5) (ANALISTA N°1)**

<b>Tiempo de Retención</b>	<b>Área</b>	<b>Altura</b>	<b>Contenido en la muestra (mg)</b>	<b>Nombre</b>
23,859	315135	88948	11,5	Éster Metílico de Ácido Palmítico
27,178	128747	37470	4,7	Éster Metílico de Ácido Esteárico
28,287	635445	158856	23,2	Éster Metílico de Ácido Oleico
29,874	1691613	360248	68,0	Éster Metílico de Ácido Linoleico
30,249	9789	3046	0,4	Éster Metílico de Ácido Araquidoico
31,275	4313	1417	0,2	Éster Metílico de Ácido Eicosenoico
31,582	233332	68332	10,4	Éster Metílico de Ácido Linolénico
33,233	9841	3001	0,4	Éster Metílico de Ácido Behénico

Analysis Date & Time : 10/11/2009 01:35:08 p.m.  
 User Name : Admin  
 Vial# : 1  
 Sample Name : Muestra Biodiesel  
 Sample ID : B100  
 Sample Type : Unknown  
 Injection Volume : 1.00  
 ISTD Amount :

Data Name : G:\Tesis\Tesis Data\F.A.M.E. Nuevo 5.gcd  
 Method Name : C:\WINDOWS\Data\Project1\FAMES Método Propuesto.gcm



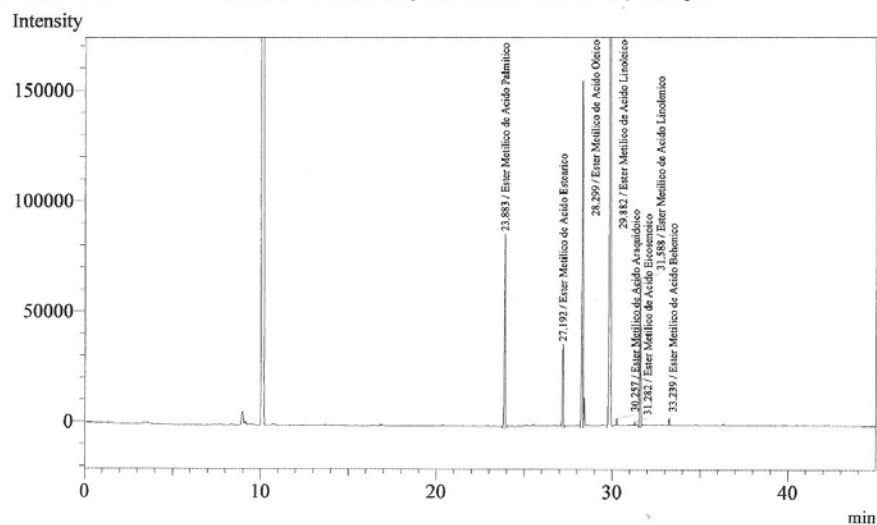
Peak#	Ret.Time	Area	Height	ID#	Cmpd Name
1	23.859	315135	88948	12	Ester Metilico de Acido Palmítico
2	27.178	128747	37470	16	Ester Metilico de Acido Estearico
3	28.287	635445	158856	18	Ester Metilico de Acido Oleico
4	29.874	1691613	360248	20	Ester Metilico de Acido Linoleico
5	30.249	9789	3046	21	Ester Metilico de Acido Araquidoico
6	31.275	4313	1417	23	Ester Metilico de Acido Eicosenoico
7	31.582	233332	68332	24	Ester Metilico de Acido Linolenico
8	33.233	9841	3001	27	Ester Metilico de Acido Behenico
Total		3028215	721318		

**TABLA N°10 ANALISIS SEMICUANTITATIVO DE ESTERES METILICOS DE  
ACIDO GRASO EN MUESTRA DE BIODIESEL OBTENIDO A PARTIR DE  
ACEITE DE PALMA (LECTURA N°6) (ANALISTA N°1)**

<b>Tiempo de Retención</b>	<b>Área</b>	<b>Altura</b>	<b>Contenido en la muestra (mg)</b>	<b>Nombre</b>
23,883	316458	87225	11,5	Éster Metílico de Ácido Palmítico
27,192	129003	36970	4,7	Éster Metílico de Ácido Esteárico
28,299	629558	156181	23,0	Éster Metílico de Ácido Oleico
29,882	1662230	351836	66,8	Éster Metílico de Ácido Linoleico
30,257	8972	2922	0,3	Éster Metílico de Ácido Araquidoico
31,282	3721	1324	0,1	Éster Metílico de Ácido Eicosenoico
31,588	233039	66977	10,4	Éster Metílico de Ácido Linolénico
33,239	9593	2932	0,3	Éster Metílico de Ácido Behénico

Analysis Date & Time : 11/11/2009 10:35:51 a.m.  
 User Name : Admin  
 Vial# : 1  
 Sample Name : Muestra Biodiesel  
 Sample ID : B100  
 Sample Type : Unknown  
 Injection Volume : 1.00  
 ISTD Amount :

Data Name : G:\Tesis\Tesis Data\F.A.M.E. Nuevo 6.gcd  
 Method Name : C:\WINDOWS\Data\Project1\FAMES Método Propuesto.gcm



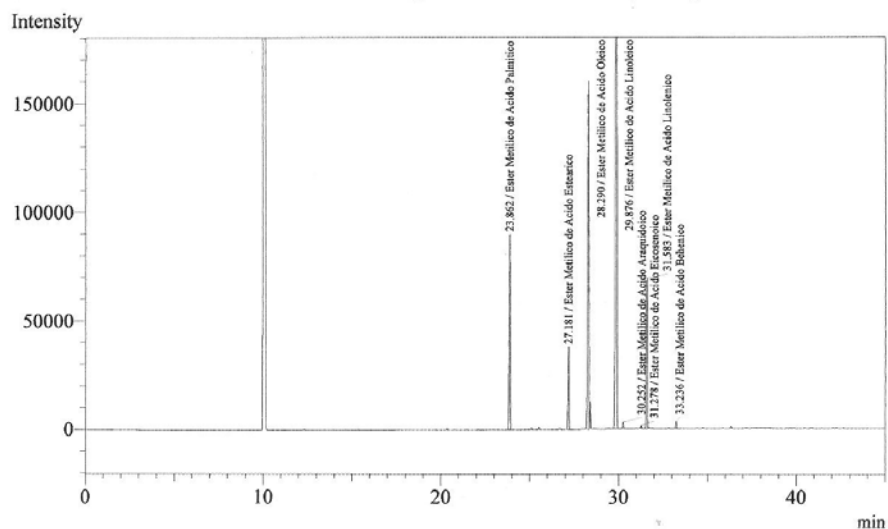
Peak#	Ret.Time	Area	Height	ID#	Cmpd Name
1	23.883	316458	87225	12	Ester Metilico de Acido Palmítico
2	27.192	129003	36970	16	Ester Metilico de Acido Estearico
3	28.299	629558	156181	18	Ester Metilico de Acido Oleico
4	29.882	1662230	351836	20	Ester Metilico de Acido Linoleico
5	30.257	8972	2922	21	Ester Metilico de Acido Araquidoico
6	31.282	3721	1324	23	Ester Metilico de Acido Eicosenoico
7	31.588	233039	66977	24	Ester Metilico de Acido Linolenico
8	33.239	9593	2932	27	Ester Metilico de Acido Behenico
Total		2992574	706367		

**TABLA N°11 ANALISIS SEMICUANTITATIVO DE ESTERES METILICOS DE  
ACIDO GRASO EN MUESTRA DE BIODIESEL OBTENIDO A PARTIR DE  
ACEITE DE PALMA (LECTURA N°1) (ANALISTA N°2)**

<b>Tiempo de Retención</b>	<b>Área</b>	<b>Altura</b>	<b>Contenido en la muestra (mg)</b>	<b>Nombre</b>
23,862	317138	89151	11,5	Éster Metílico de Ácido Palmítico
27,181	129841	37667	4,8	Éster Metílico de Ácido Esteárico
28,290	641870	159210	23,5	Éster Metílico de Ácido Oleico
29,876	1707132	362162	68,6	Éster Metílico de Ácido Linoleico
30,252	9490	3057	0,3	Éster Metílico de Ácido Araquidoico
31,278	4234	1417	0,2	Éster Metílico de Ácido Eicosenoico
31,583	234937	68893	10,4	Éster Metílico de Ácido Linolénico
33,236	10060	3039	0,4	Éster Metílico de Ácido Behénico

Analysis Date & Time : 11/11/2009 11:24:12 a.m.  
 User Name : Admin  
 Vial# : 1  
 Sample Name : Muestra Biodiesel  
 Sample ID : B100  
 Sample Type : Unknown  
 Injection Volume : 1.00  
 ISTD Amount :

Data Name : G:\Tesis\Tesis Data\F.A.M.E. Nuevo 7.gcd  
 Method Name : C:\WINDOWS\Data\Project1\FAMES Método Propuesto.gcm



Peak#	Ret.Time	Area	Height	ID#	Cmpd Name
1	23.862	317138	89151	12	Ester Metilico de Acido Palmítico
2	27.181	129841	37667	16	Ester Metilico de Acido Estearico
3	28.290	641870	159210	18	Ester Metilico de Acido Oleico
4	29.876	1707132	362162	20	Ester Metilico de Acido Linoleico
5	30.252	9490	3057	21	Ester Metilico de Acido Araquidoico
6	31.278	4234	1417	23	Ester Metilico de Acido Eicosenoico
7	31.583	234937	68893	24	Ester Metilico de Acido Linolenico
8	33.236	10060	3039	27	Ester Metilico de Acido Behenico
Total		3054702	724596		

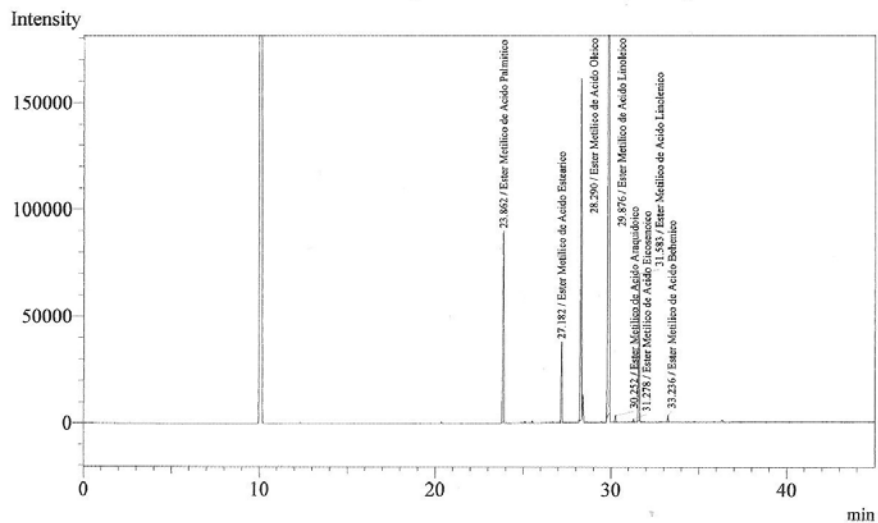
**TABLA N°12 ANALISIS SEMICUANTITATIVO DE ESTERES METILICOS DE  
ACIDO GRASO EN MUESTRA DE BIODIESEL OBTENIDO A PARTIR DE  
ACEITE DE PALMA (LECTURA N°2) (ANALISTA N°2)**

<b>Tiempo de Retención</b>	<b>Área</b>	<b>Altura</b>	<b>Contenido en la muestra (mg)</b>	<b>Nombre</b>
23,862	312240	88866	11,4	Éster Metílico de Ácido Palmítico
27,182	127874	37409	4,7	Éster Metílico de Ácido Esteárico
28,290	631745	158770	23,1	Éster Metílico de Ácido Oleico
29,876	1672176	358039	67,2	Éster Metílico de Ácido Linoleico
30,252	9635	3065	0,3	Éster Metílico de Ácido Araquidoico
31,278	4334	1427	0,2	Éster Metílico de Ácido Eicosenoico
31,583	229241	68453	10,2	Éster Metílico de Ácido Linolénico
33,236	9983	3034	0,4	Éster Metílico de Ácido Behénico



Analysis Date & Time : 11/11/2009 12:12:33 p.m.  
 User Name : Admin  
 Vial# : 1  
 Sample Name : Muestra Biodiesel  
 Sample ID : B100  
 Sample Type : Unknown  
 Injection Volume : 1.00  
 ISTD Amount :

Data Name : G:\Tesis\Tesis Data\F.A.M.E. Nuevo 8.gcd  
 Method Name : C:\WINDOWS\Data\Project1\FAMES Método Propuesto.gcm



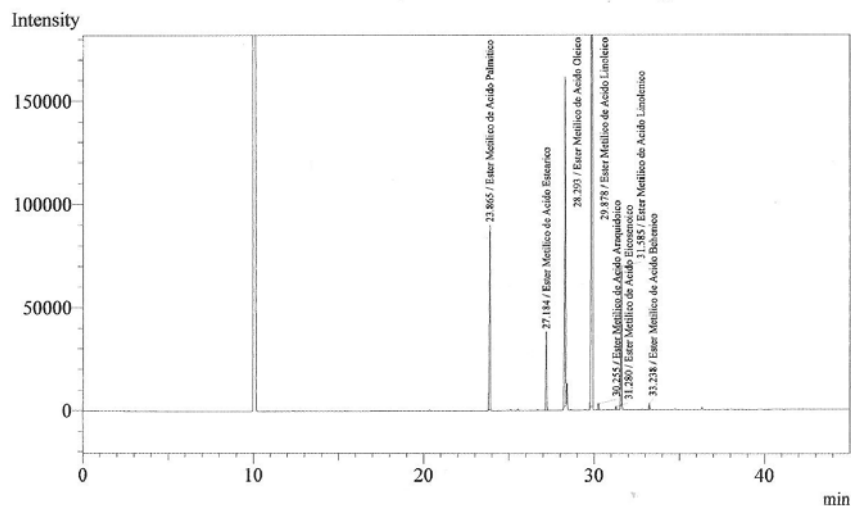
Peak#	Ret. Time	Area	Height	ID#	Cmpd Name
1	23.862	312240	88866	12	Ester Metilico de Acido Palmítico
2	27.182	127874	37409	16	Ester Metilico de Acido Estearico
3	28.290	631745	158770	18	Ester Metilico de Acido Oleico
4	29.876	1672176	358039	20	Ester Metilico de Acido Linoleico
5	30.252	9635	3065	21	Ester Metilico de Acido Araquidoico
6	31.278	4334	1427	23	Ester Metilico de Acido Eicosenoico
7	31.583	229241	68453	24	Ester Metilico de Acido Linolenico
8	33.236	9983	3034	27	Ester Metilico de Acido Behenico
Total		2997228	719063		

**TABLA N°13 ANALISIS SEMICUANTITATIVO DE ESTERES METILICOS DE  
ACIDO GRASO EN MUESTRA DE BIODIESEL OBTENIDO A PARTIR DE  
ACEITE DE PALMA (LECTURA N°3) (ANALISTA N°2)**

<b>Tiempo de Retención</b>	<b>Área</b>	<b>Altura</b>	<b>Contenido en la muestra (mg)</b>	<b>Nombre</b>
23,865	312752	88666	11,4	Éster Metílico de Ácido Palmítico
27,184	130610	37712	4,8	Éster Metílico de Ácido Esteárico
28,293	626479	159024	22,9	Éster Metílico de Ácido Oleico
29,878	1694853	361962	68,1	Éster Metílico de Ácido Linoleico
30,255	9644	3049	0,3	Éster Metílico de Ácido Araquidoico
31,280	4068	1397	0,2	Éster Metílico de Ácido Eicosenoico
31,585	215377	66442	9,6	Éster Metílico de Ácido Linolénico
33,238	10047	3054	0,4	Éster Metílico de Ácido Behénico

Analysis Date & Time : 11/11/2009 01:00:57 p.m.  
 User Name : Admin  
 Vial# : 1  
 Sample Name : Muestra Biodiesel  
 Sample ID : B100  
 Sample Type : Unknown  
 Injection Volume : 1.00  
 ISTD Amount :

Data Name : G:\Tesis\Tesis Data\F.A.M.E. Nuevo 9.gcd  
 Method Name : C:\WINDOWS\Data\Project1\FAMES Método Propuesto.gcm



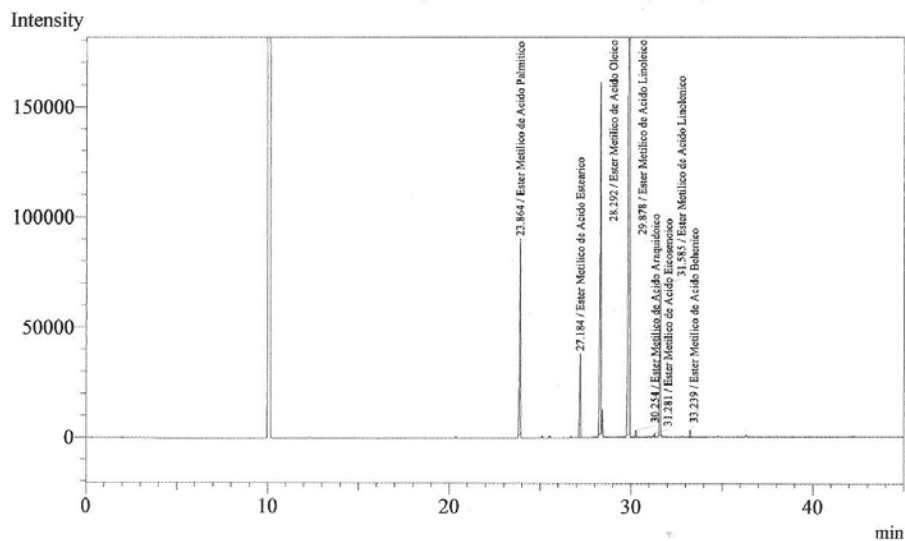
Peak#	Ret.Time	Area	Height	ID#	Cmpd Name
1	23.865	312752	88666	12	Ester Metilico de Acido Palmítico
2	27.184	130610	37712	16	Ester Metilico de Acido Estearico
3	28.293	626479	159024	18	Ester Metilico de Acido Oleico
4	29.878	1694853	361962	20	Ester Metilico de Acido Linoleico
5	30.255	9644	3049	21	Ester Metilico de Acido Araquidico
6	31.280	4068	1397	23	Ester Metilico de Acido Eicosenoico
7	31.585	215377	66442	24	Ester Metilico de Acido Linolenico
8	33.238	10047	3054	27	Ester Metilico de Acido Behenico
Total		3003830	721306		

**TABLA N°14 ANALISIS SEMICUANTITATIVO DE ESTERES METILICOS DE  
ACIDO GRASO EN MUESTRA DE BIODIESEL OBTENIDO A PARTIR DE  
ACEITE DE PALMA (LECTURA N°4) (ANALISTA N°2)**

<b>Tiempo de Retención</b>	<b>Área</b>	<b>Altura</b>	<b>Contenido en la muestra (mg)</b>	<b>Nombre</b>
23,864	304343	87993	11,1	Éster Metílico de Ácido Palmítico
27,184	130881	37712	4,8	Éster Metílico de Ácido Esteárico
28,292	628876	159154	23,0	Éster Metílico de Ácido Oleico
29,878	1698089	362259	68,2	Éster Metílico de Ácido Linoleico
30,254	9300	3014	0,3	Éster Metílico de Ácido Araquidoico
31,281	4337	1428	0,2	Éster Metílico de Ácido Eicosenoico
31,585	227970	67807	10,1	Éster Metílico de Ácido Linolénico
33,239	9888	3036	0,4	Éster Metílico de Ácido Behénico

Analysis Date & Time : 11/11/2009 01:49:20 p.m.  
 User Name : Admin  
 Vial# : 1  
 Sample Name : Muestra Biodiesel  
 Sample ID : B100  
 Sample Type : Unknown  
 Injection Volume : 1.00  
 ISTD Amount :

Data Name : G:\Tesis\Tesis Data\F.A.M.E. Nuevo 10.gcd  
 Method Name : C:\WINDOWS\Data\Project1\FAMES Método Propuesto.gcm



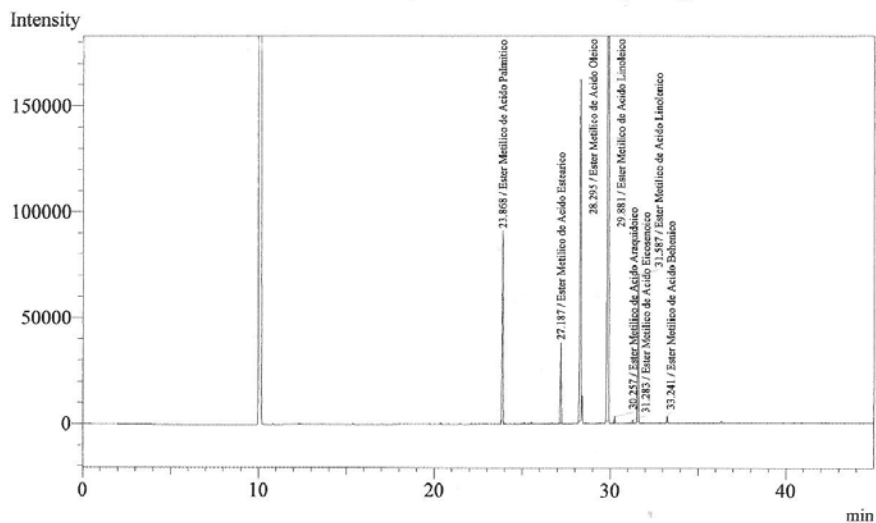
Peak#	Ret.Time	Area	Height	ID#	Cmpd Name
1	23.864	304343	87993	12	Ester Metilico de Acido Palmítico
2	27.184	130881	37712	16	Ester Metilico de Acido Estearico
3	28.292	628876	159154	18	Ester Metilico de Acido Oleico
4	29.878	1698089	362259	20	Ester Metilico de Acido Linoleico
5	30.254	9300	3014	21	Ester Metilico de Acido Araquidoico
6	31.281	4337	1428	23	Ester Metilico de Acido Eicosenoico
7	31.585	227970	67807	24	Ester Metilico de Acido Linolenico
8	33.239	9888	3036	27	Ester Metilico de Acido Behenico
Total		3013684	722403		

**TABLA N°15 ANALISIS SEMICUANTITATIVO DE ESTERES METILICOS DE  
ACIDO GRASO EN MUESTRA DE BIODIESEL OBTENIDO A PARTIR DE  
ACEITE DE PALMA (LECTURA N°5) (ANALISTA N°2)**

<b>Tiempo de Retención</b>	<b>Área</b>	<b>Altura</b>	<b>Contenido en la muestra (mg)</b>	<b>Nombre</b>
23,868	308252	88971	11,2	Éster Metílico de Ácido Palmítico
27,187	129365	37798	4,7	Éster Metílico de Ácido Esteárico
28,295	638791	160183	23,4	Éster Metílico de Ácido Oleico
29,881	1715727	362648	68,9	Éster Metílico de Ácido Linoleico
30,257	9417	3075	0,3	Éster Metílico de Ácido Araquidoico
31,283	4398	1432	0,2	Éster Metílico de Ácido Eicosenoico
31,587	228933	68905	10,2	Éster Metílico de Ácido Linolénico
33,241	8287	2797	0,3	Éster Metílico de Ácido Behénico

Analysis Date & Time : 11/11/2009 02:37:44 p.m.  
 User Name : Admin  
 Vial# : 1  
 Sample Name : Muestra Biodiesel  
 Sample ID : B100  
 Sample Type : Unknown  
 Injection Volume : 1.00  
 ISTD Amount :

Data Name : G:\Tesis\Tesis Data\F.A.M.E. Nuevo 11.gcd  
 Method Name : C:\WINDOWS\Data\Project1\FAMES Método Propuesto.gcm



Peak#	Ret.Time	Area	Height	ID#	Cmpd Name
1	23.868	308252	88971	12	Ester Metilico de Acido Palmítico
2	27.187	129365	37798	16	Ester Metilico de Acido Estearico
3	28.295	638791	160183	18	Ester Metilico de Acido Oleico
4	29.881	1715727	362648	20	Ester Metilico de Acido Linoleico
5	30.257	9417	3075	21	Ester Metilico de Acido Araquidoico
6	31.283	4398	1432	23	Ester Metilico de Acido Eicosenoico
7	31.587	228933	68905	24	Ester Metilico de Acido Linolenico
8	33.241	8287	2797	27	Ester Metilico de Acido Behenico
Total		3043170	725809		

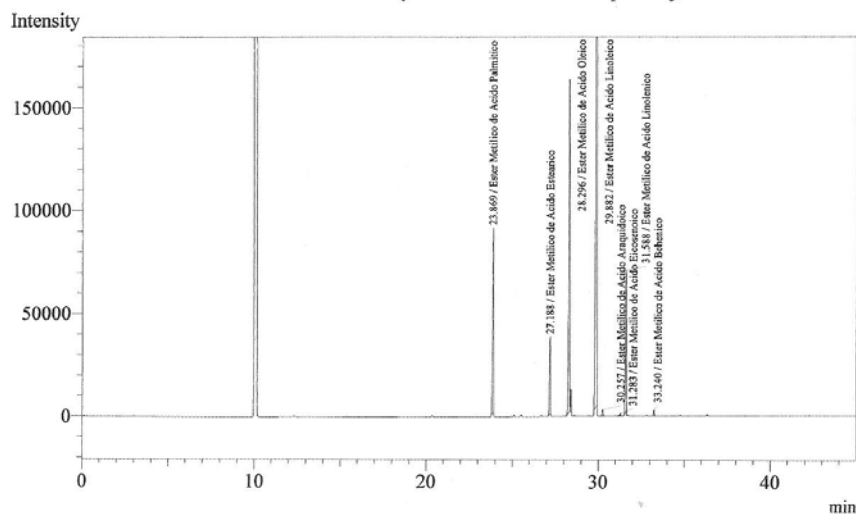
**TABLA N°16 ANALISIS SEMICUANTITATIVO DE ESTERES METILICOS DE  
ACIDO GRASO EN MUESTRA DE BIODIESEL OBTENIDO A PARTIR DE  
ACEITE DE PALMA (LECTURA N°6) (ANALISTA N°2)**

<b>Tiempo de Retención</b>	<b>Área</b>	<b>Altura</b>	<b>Contenido en la muestra (mg)</b>	<b>Nombre</b>
23,869	310092	89522	11,3	Éster Metílico de Ácido Palmítico
27,188	123690	37237	4,5	Éster Metílico de Ácido Esteárico
28,296	637784	161103	23,3	Éster Metílico de Ácido Oleico
29,882	1694428	362493	68,1	Éster Metílico de Ácido Linoleico
30,257	9800	3122	0,4	Éster Metílico de Ácido Araquidoico
31,283	5814	1533	0,2	Éster Metílico de Ácido Eicosenoico
31,588	224467	68321	10,0	Éster Metílico de Ácido Linolénico
33,240	10264	3090	0,4	Éster Metílico de Ácido Behénico



Analysis Date & Time : 11/11/2009 03:26:08 p.m.  
 User Name : Admin  
 Vial# : 1  
 Sample Name : Muestra Biodiesel  
 Sample ID : B100  
 Sample Type : Unknown  
 Injection Volume : 1.00  
 ISTD Amount :

Data Name : G:\Tesis\Tesis Data\F.A.M.E. Nuevo 12.gcd  
 Method Name : C:\WINDOWS\Data\Project1\FAMES Método Propuesto.gcm



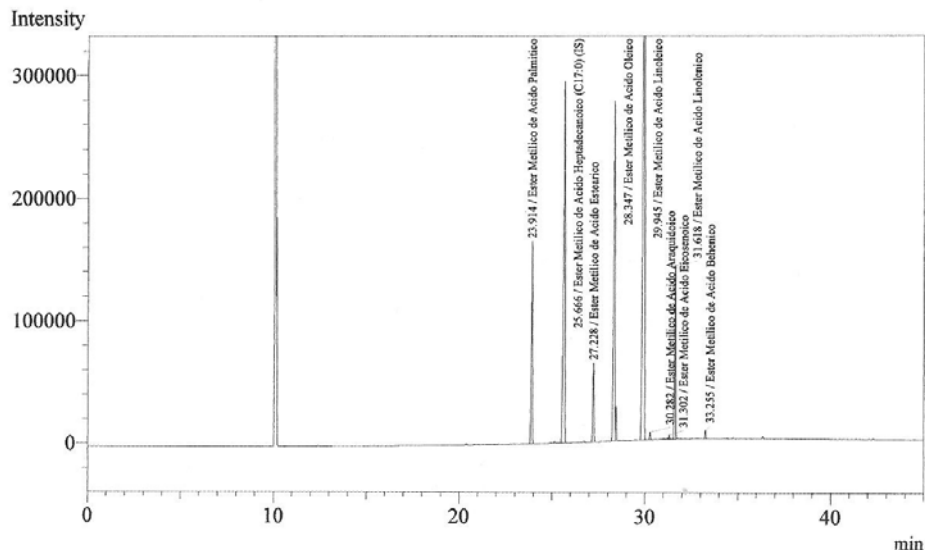
Peak#	Ret. Time	Area	Height	ID#	Cmpd Name
1	23.869	310092	89522	12	Ester Metilico de Acido Palmítico
2	27.188	123690	37237	16	Ester Metilico de Acido Estearico
3	28.296	637784	161103	18	Ester Metilico de Acido Oleico
4	29.882	1694428	362493	20	Ester Metilico de Acido Linoleico
5	30.257	9800	3122	21	Ester Metilico de Acido Araquidico
6	31.283	5814	1533	23	Ester Metilico de Acido Eicosenoico
7	31.588	224467	68321	24	Ester Metilico de Acido Linolenico
8	33.240	10264	3090	27	Ester Metilico de Acido Behenico
Total		3016339	726421		

**TABLA N°17 CUANTIFICACION DE ESTERES METILICOS DE ACIDO GRASO  
EN MUESTRA DE BIODIESEL OBTENIDO A PARTIR DE ACEITE DE PALMA  
SEGÚN NORMA INTERNACIONAL (LECTURA N°1)**

<b>Tiempo de Retención</b>	<b>Área</b>	<b>Altura</b>	<b>Nombre</b>
23,914	677125	164378	Éster Metílico de Ácido Palmítico
25,666	1686589	293682	Éster Metílico de Ácido Heptadecanoico (C17:0) (IS)
27,228	276164	64033	Éster Metílico de Ácido Esteárico
28,347	1365011	275665	Éster Metílico de Ácido Oleico
29,945	3603075	594337	Éster Metílico de Ácido Linoleico
30,282	20459	6248	Éster Metílico de Ácido Araquidoico
31,302	11121	3274	Éster Metílico de Ácido Eicosenoico
31,618	504554	139778	Éster Metílico de Ácido Linolénico
33,255	20921	6335	Éster Metílico de Ácido Behénico

Analysis Date & Time : 09/11/2009 02:27:32 p.m.  
 User Name : Admin  
 Vial# : 3  
 Sample Name : Biodiesel B100  
 Sample ID : Biodiesel B100  
 Sample Type : Standard  
 Injection Volume : 1.00  
 ISTD Amount :

Data Name : G:\Tesis\Tesis Data\F.A.M.E. EN 14103 (1).gcd  
 Method Name : C:\WINDOWS\Data\Project1\FAMES EN 14103.gcm  
 [Description]  
 255.1mg de Muestra + 5 mL de Solución de Heptadecanoato de Metilo 10 mg/mL



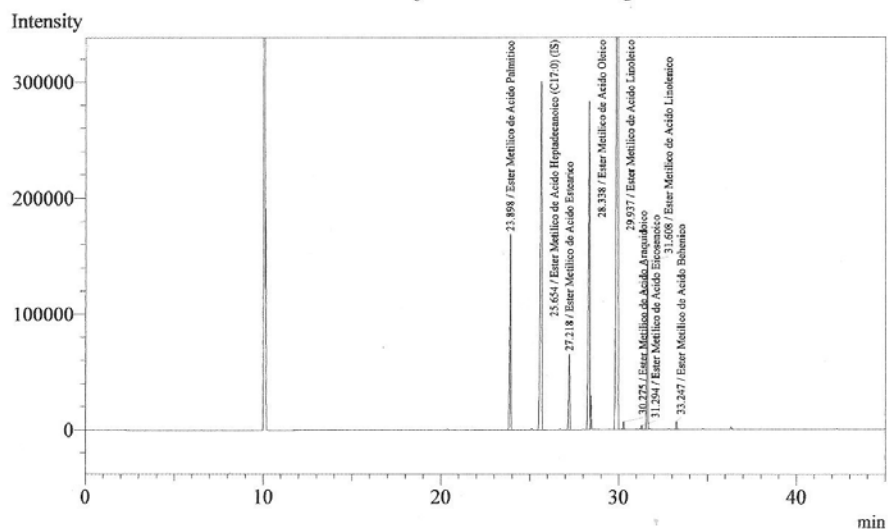
Peak#	Ret.Time	Area	Height	ID#	Cmpd Name
1	23.914	677125	164378	12	Ester Metilico de Acido Palmítico
2	25.666	1686589	293682	14	Ester Metilico de Acido Heptadecanoico (C17:0)
3	27.228	276164	64033	16	Ester Metilico de Acido Estearico
4	28.347	1365011	275665	18	Ester Metilico de Acido Oleico
5	29.945	3603075	594337	20	Ester Metilico de Acido Linoleico
6	30.282	20459	6248	21	Ester Metilico de Acido Araquidoico
7	31.302	11121	3274	23	Ester Metilico de Acido Eicosenoico
8	31.618	504554	139778	24	Ester Metilico de Acido Linolenico
9	33.255	20921	6335	27	Ester Metilico de Acido Behenico
Total		8165019	1547730		

**TABLA N°18 CUANTIFICACION DE ESTERES METILICOS DE ACIDO GRASO  
EN MUESTRA DE BIODIESEL OBTENIDO A PARTIR DE ACEITE DE PALMA  
SEGÚN NORMA INTERNACIONAL (LECTURA N°2)**

<b>Tiempo de Retención</b>	<b>Área</b>	<b>Altura</b>	<b>Nombre</b>
23,898	695399	167803	Éster Metílico de Ácido Palmítico
25,654	1733022	299413	Éster Metílico de Ácido Heptadecanoico (C17:0) (IS)
27,218	283786	64909	Éster Metílico de Ácido Esteárico
28,338	1402312	281960	Éster Metílico de Ácido Oleico
29,937	3705820	603363	Éster Metílico de Ácido Linoleico
30,275	21033	6424	Éster Metílico de Ácido Araquidoico
31,294	11227	3356	Éster Metílico de Ácido Eicosenoico
31,608	518160	143801	Éster Metílico de Ácido Linolénico
33,247	21484	6484	Éster Metílico de Ácido Behénico

Analysis Date & Time : 10/11/2009 02:24:34 p.m.  
 User Name : Admin  
 Vial# : 1  
 Sample Name : Muestra Biodiesel  
 Sample ID : B100  
 Sample Type : Unknown  
 Injection Volume : 1.00  
 ISTD Amount :

Data Name : G:\Tesis\Tesis Data\F.A.M.E. EN 14103 (2).gcd  
 Method Name : C:\WINDOWS\Data\Project1\FAMES EN 14103.gcm



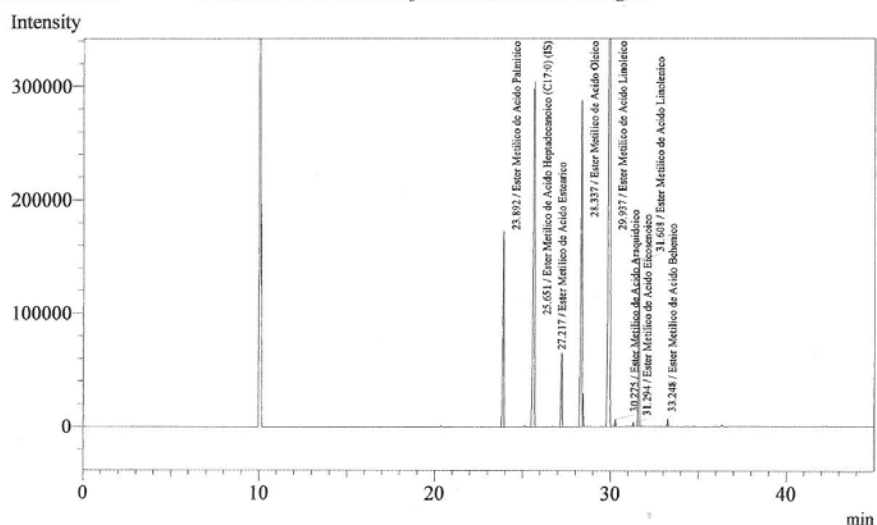
Peak#	Ret.Time	Area	Height	ID#	Cmpd Name
1	23.898	695399	167803	12	Ester Metilico de Acido Palmítico
2	25.654	1733022	299413	14	Ester Metilico de Acido Heptadecanoico (C17:0)
3	27.218	283786	64909	16	Ester Metilico de Acido Estearico
4	28.338	1402312	281960	18	Ester Metilico de Acido Oleico
5	29.937	3705820	603363	20	Ester Metilico de Acido Linoleico
6	30.275	21033	6424	21	Ester Metilico de Acido Araquidoico
7	31.294	11227	3356	23	Ester Metilico de Acido Eicosenoico
8	31.608	518160	143801	24	Ester Metilico de Acido Linolenico
9	33.247	21484	6484	27	Ester Metilico de Acido Behenico
Total		8392243	1577513		

**TABLA N°19 CUANTIFICACION DE ESTERES METILICOS DE ACIDO GRASO  
EN MUESTRA DE BIODIESEL OBTENIDO A PARTIR DE ACEITE DE PALMA  
SEGÚN NORMA INTERNACIONAL (LECTURA N°3)**

<b>Tiempo de Retención</b>	<b>Área</b>	<b>Altura</b>	<b>Nombre</b>
23,892	713713	171486	Éster Metílico de Ácido Palmítico
25,651	1777221	303539	Éster Metílico de Ácido Heptadecanoico (C17:0) (IS)
27,217	291110	65285	Éster Metílico de Ácido Esteárico
28,337	1441071	286190	Éster Metílico de Ácido Oleico
29,937	3799690	611375	Éster Metílico de Ácido Linoleico
30,275	21598	6591	Éster Metílico de Ácido Araquidoico
31,294	11368	3421	Éster Metílico de Ácido Eicosenoico
31,608	531813	146736	Éster Metílico de Ácido Linolénico
33,248	21932	6651	Éster Metílico de Ácido Behénico

Analysis Date & Time : 10/11/2009 03:12:57 p.m.  
 User Name : Admin  
 Vial# : 1  
 Sample Name : Muestra Biodiesel  
 Sample ID : B100  
 Sample Type : Unknown  
 Injection Volume : 1.00  
 ISTD Amount :

Data Name : G:\Tesis\Tesis Data\F.A.M.E. EN 14103 (3).gcd  
 Method Name : C:\WINDOWS\Data\Project1\FAMES EN 14103.gcm



Peak#	Ret.Time	Area	Height	ID#	Cmpd Name
1	23.892	713713	171486	12	Ester Metilico de Acido Palmítico
2	25.651	1777221	303539	14	Ester Metilico de Acido Heptadecanoico (C17:0)
3	27.217	291110	65285	16	Ester Metilico de Acido Estearico
4	28.337	1441071	286190	18	Ester Metilico de Acido Oleico
5	29.937	3799690	611375	20	Ester Metilico de Acido Linoleico
6	30.275	21598	6591	21	Ester Metilico de Acido Araquidoico
7	31.294	11368	3421	23	Ester Metilico de Acido Eicosenoico
8	31.608	531813	146736	24	Ester Metilico de Acido Linolenico
9	33.248	21932	6651	27	Ester Metilico de Acido Behenico
Total		8609516	1601274		

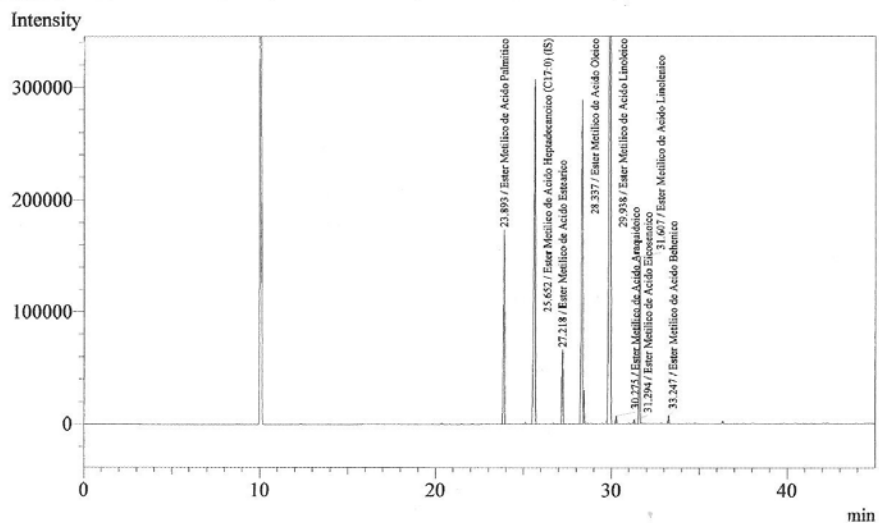
**TABLA N°20 CUANTIFICACION DE ESTERES METILICOS DE ACIDO GRASO  
EN MUESTRA DE BIODIESEL OBTENIDO A PARTIR DE ACEITE DE PALMA  
SEGÚN NORMA INTERNACIONAL (LECTURA N°4)**

<b>Tiempo de Retención</b>	<b>Área</b>	<b>Altura</b>	<b>Nombre</b>
23,893	720365	172157	Éster Metílico de Ácido Palmítico
25,652	1793707	306268	Éster Metílico de Ácido Heptadecanoico (C17:0) (IS)
27,218	293518	65517	Éster Metílico de Ácido Esteárico
28,347	1452634	287526	Éster Metílico de Ácido Oleico
29,938	3829976	615976	Éster Metílico de Ácido Linoleico
30,275	21674	6633	Éster Metílico de Ácido Araquidoico
31,294	11362	3434	Éster Metílico de Ácido Eicosenoico
31,607	535545	147464	Éster Metílico de Ácido Linolénico
33,247	22145	6703	Éster Metílico de Ácido Behénico



Analysis Date & Time : 10/11/2009 04:01:20 p.m.  
 User Name : Admin  
 Vial# : 1  
 Sample Name : Muestra Biodiesel  
 Sample ID : B100  
 Sample Type : Unknown  
 Injection Volume : 1.00  
 ISTD Amount :

Data Name : G:\Tesis\Tesis Data\F.A.M.E. EN 14103 (4).gcd  
 Method Name : C:\WINDOWS\Data\Project1\FAMES EN 14103.gcm



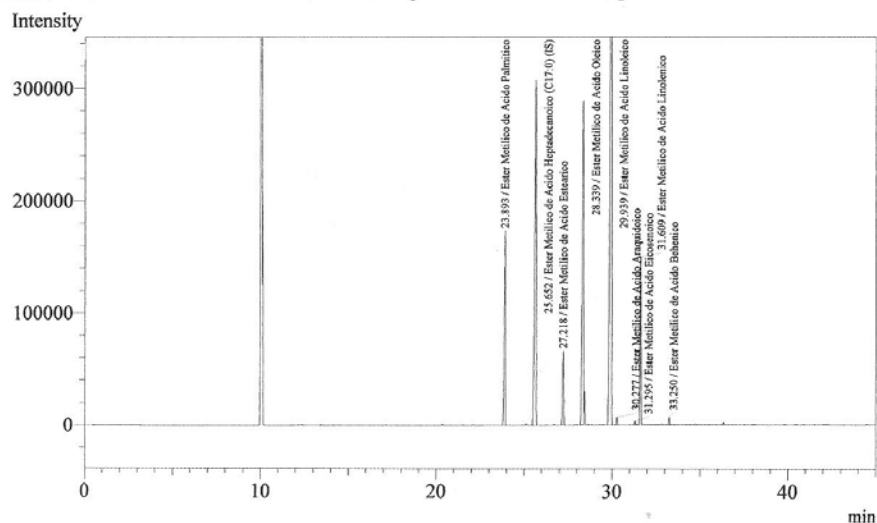
Peak#	Ret. Time	Area	Height	ID#	Cmpd Name
1	23.893	720365	172157	12	Ester Metilico de Acido Palmítico
2	25.652	1793707	306268	14	Ester Metilico de Acido Heptadecanoico (C17:0)
3	27.218	293518	65517	16	Ester Metilico de Acido Estearico
4	28.337	1452634	287526	18	Ester Metilico de Acido Oleico
5	29.938	3829976	615976	20	Ester Metilico de Acido Linoleico
6	30.275	21674	6633	21	Ester Metilico de Acido Araquidoico
7	31.294	11362	3434	23	Ester Metilico de Acido Eicosenoico
8	31.607	535545	147464	24	Ester Metilico de Acido Linolenico
9	33.247	22145	6703	27	Ester Metilico de Acido Behenico
Total		8680926	1611678		

**TABLA N°21 CUANTIFICACION DE ESTERES METILICOS DE ACIDO GRASO  
EN MUESTRA DE BIODIESEL OBTENIDO A PARTIR DE ACEITE DE PALMA  
SEGÚN NORMA INTERNACIONAL (LECTURA N°5)**

<b>Tiempo de Retención</b>	<b>Área</b>	<b>Altura</b>	<b>Nombre</b>
23,893	720694	172543	Éster Metílico de Ácido Palmítico
25,652	1796307	306427	Éster Metílico de Ácido Heptadecanoico (C17:0) (IS)
27,218	294421	65665	Éster Metílico de Ácido Esteárico
28,339	1453565	287952	Éster Metílico de Ácido Oleico
29,939	3836130	619717	Éster Metílico de Ácido Linoleico
30,277	21914	6671	Éster Metílico de Ácido Araquidoico
31,295	11486	3447	Éster Metílico de Ácido Eicosenoico
31,609	536744	148220	Éster Metílico de Ácido Linolénico
33,250	22167	6749	Éster Metílico de Ácido Behénico

Analysis Date & Time : 10/11/2009 04:49:40 p.m.  
 User Name : Admin  
 Vial# : 1  
 Sample Name : Muestra Biodiesel  
 Sample ID : B100  
 Sample Type : Unknown  
 Injection Volume : 1.00  
 ISTD Amount :

Data Name : G:\Tesis\Tesis Data\F.A.M.E. EN 14103 (5).gcd  
 Method Name : C:\WINDOWS\Data\Project1\FAMES EN 14103.gcm



Peak#	Ret.Time	Area	Height	ID#	Cmpd Name
1	23.893	720694	172543	12	Ester Metilico de Acido Palmítico
2	25.652	1796307	306427	14	Ester Metilico de Acido Heptadecanoico (C17:0)
3	27.218	294421	65665	16	Ester Metilico de Acido Estearico
4	28.339	1453565	287952	18	Ester Metilico de Acido Oleico
5	29.939	3836130	619717	20	Ester Metilico de Acido Linoleico
6	30.277	21914	6671	21	Ester Metilico de Acido Araquidoico
7	31.295	11486	3447	23	Ester Metilico de Acido Eicosenoico
8	31.609	536744	148220	24	Ester Metilico de Acido Linolenico
9	33.250	22167	6749	27	Ester Metilico de Acido Behenico
Total		8693428	1617391		

**TABLA N°22** FACTORES DE RESPUESTA DEL DETECTOR FID, PARA CADA ÉSTER METÍLICO DE ÁCIDO GRASO ENCONTRADO EN LA MUESTRA.

<b>Nombre</b>	<b>Factor de Respuesta del Detector FID (mg/Área)</b>
Éster Metílico de Ácido Palmítico	$3,6389 \times 10^{-5}$
Éster Metílico de Ácido Esteárico	$3,6630 \times 10^{-5}$
Éster Metílico de Ácido Oleico	$3,6562 \times 10^{-5}$
Éster Metílico de Ácido Linoleico	$4,0169 \times 10^{-5}$
Éster Metílico de Ácido Araquidoico	$3,5976 \times 10^{-5}$
Éster Metílico de Ácido Eicosenoico	$3,7383 \times 10^{-5}$
Éster Metílico de Ácido Linolénico	$4,4468 \times 10^{-5}$
Éster Metílico de Ácido Behénico	$3,5955 \times 10^{-5}$

**TABLA N°23 RESULTADOS DE CONTENIDO DE ÉSTERES METÍlicos  
TOTALES, EN MUESTRA DE BIODIESEL (B100), OBTENIDOS.**

<b>Analista</b>	<b>Volumen agregado de Heptano (mL)</b>	<b>Peso (mg)</b>	<b>Total de Ésteres Metílicos de Ácido Graso (mg)</b>	<b>Contenido de Ésteres Metílicos Totales (%W/W)</b>
1	10	156,7	116,7	74,47
1	10	156,7	117,7	75,11
1	10	156,7	117,3	74,86
1	10	156,7	118,2	75,43
1	10	156,7	118,6	75,69
1	10	156,7	117,2	74,79
2	10	159,0	119,6	75,22
2	10	159,0	117,4	73,84
2	10	159,0	117,6	73,96
2	10	159,0	118,1	74,28
2	10	159,0	119,2	74,97
2	10	159,0	118,1	74,28
			<b>Promedio</b>	<b>74,74</b>

**TABLA N°24 RESULTADOS DE CONTENIDO DE ÉSTERES METÍLICOS  
TOTALES EN MUESTRA DE BIODIESEL (B100), OBTENIDOS SEGÚN NORMA  
INTERNACIONAL EN-14103**

Medición	Suma de Áreas (C14 -C24)	Área del Estándar Interno	Concentración de Estándar Interno (mg/mL)	Volumen agregado de Estándar Interno (mL)	Peso (mg)	Contenido de Ésteres Metílicos Totales (%W/W)
1	8165019	1686589	10	5	255,1	75,29
2	8392243	1733022	10	5	254,2	75,58
3	8609516	1777221	10	5	256,2	75,03
4	8680926	1793707	10	5	253,9	75,61
5	8693428	1796307	10	5	255,6	75,11
					<b>Promedio</b>	<b>75,32</b>

## 6. EJEMPLO DE CALCULOS.

A continuación se muestra un ejemplo de cálculos de los resultados obtenidos anteriormente.

- **Cálculo del Factor de respuesta del Detector FID:**

El factor de respuesta de cualquier detector se calcula con los datos obtenidos a partir de los estándares, que, finalmente, se reemplazan en la siguiente fórmula:

$$f_i = \frac{c_i}{A_i}$$

Dónde:

$f_i$  : Factor de respuesta del detector del compuesto “i”.

$c_i$  : Contenido del compuesto “i” según el Certificado de Análisis del Estándar.

$A_i$  : Valor de área obtenida para el compuesto “i”, en el estándar.

Ejemplo, para el éster metílico de ácido palmítico:

$$c_i : 5,94 \text{ mg.}$$

$$A_i : 159801, 164593, 165319$$

$$\overline{A_i} = \left( \frac{159801 + 164593 + 165319}{3} \right) = 163237,67$$

$$f_i = \frac{c_i}{A_i} = \frac{5,94}{163237,67} = 3,6389 \times 10^{-5}$$

- **Cálculo del contenido de cada éster metílico de ácido graso presente en la muestra:**

El contenido de cada éster metílico de ácido graso presente en la muestra, se calcula de la siguiente forma:

$$W_i = f_i \times A_i$$

Dónde:

$W_i$  : Contenido de éster metílico de ácido graso del compuesto “i”, presente en la muestra (mg).

$f_i$  : Factor de respuesta del detector del compuesto “i”.

$A_i$  : Valor de área obtenida para el compuesto “i”, en la muestra.



Ejemplo, para el analista N°1, en la lectura N°1, para el éster metílico de ácido palmítico, se tiene lo siguiente:

$$W_i = f_i \times A_i = (3,6389 \times 10^{-5}) \times 311076 = 11,3 \text{ mg}$$

De igual manera se procedió para todos los ésteres metílicos de ácido graso presentes en la muestra.

- **Cálculo del contenido total de ésteres metílicos de ácido graso, en una muestra de biodiesel:**

El contenido total de ésteres metílicos de ácido graso se calcula de la siguiente forma:

$$C = \frac{W_{EM}}{W_m} \times 100$$

Dónde:

$C$  : Contenido de ésteres metílicos de ácido graso expresado en % (W/W).

$W_{EM}$  : Contenido total de ésteres metílicos de ácido graso expresado en miligramos.

$W_m$  : Peso de muestra expresado en mg.

Ejemplo, para el analista N°1, en la lectura N°1, se sabe que el peso de muestra es 156,7 mg y también se tienen los siguientes datos:

Nombre	Área	Contenido en la muestra (mg)
Éster Metílico de Ácido Palmítico	311076	11,3
Éster Metílico de Ácido Esteárico	127108	4,7
Éster Metílico de Ácido Oleico	643731	23,5
Éster Metílico de Ácido Linoleico	1645325	66,1
Éster Metílico de Ácido Araquidoico	8901	0,3
Éster Metílico de Ácido Eicosenoico	3908	0,1
Éster Metílico de Ácido Linolénico	230567	10,3
Éster Metílico de Ácido Behénico	9329	0,3
<b>Total</b>		<b>116,7</b>

El contenido total de ésteres metílicos de ácido graso se calcula de la siguiente forma:

$$C = \frac{W_{EM}}{W_m} \times 100 = \frac{116,7}{156,7} \times 100 = 74,47\%$$

Dónde:

$C$  : Contenido de ésteres metílicos de ácido graso expresado en % (W/W).

$W_{EM}$  : Contenido total de ésteres metílicos de ácido graso expresado en miligramos.

$W_m$  : Peso de muestra expresado en mg.

- **Cálculo del contenido total de ésteres metílicos de ácido graso, en una muestra de biodiesel, de acuerdo a la norma EN - 14103:**

Para el conocimiento de dicha norma, se adjunta una copia en la sección anexos.

## **7. EVALUACIÓN DE RESULTADOS.**

Después de obtenidos los resultados, se evaluó la cuantificación de los ésteres metílicos de ácido graso en una muestra de biodiesel obtenida a partir de aceite de palma. De acuerdo a los requerimientos de las normas internacionales se consideraron la verificación de la **exactitud** (ISO 17025) y la **precisión** (ISO 5725-2), debido a que estos parámetros son los más importantes para poder comprobar la veracidad de los resultados de una cuantificación analítica.

### **7.1. EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DE LOS DATOS OBTENIDOS.**

Para la realización de las pruebas estadísticas a realizar para la determinación de la veracidad de los datos obtenidos, mediante la verificación de la exactitud y precisión, se utilizó el software estadístico MINITAB versión 15.1.20.0. Para ello, se tuvo en cuenta un nivel de confianza del 95% ( $P_{\text{value}}=0.05$ ) en todas las pruebas estadísticas inferenciales realizadas.

### **7.2. EVALUACIÓN DE LA EXACTITUD.**

Para la evaluación de la exactitud se realizaron las siguientes pruebas:

#### **7.2.1. Verificación de comportamiento normal de residuales.**

Se evalúa mediante el Test de Anderson – Darling. Para ello se tienen los datos presentes en la siguiente tabla:

**TABLA N°25 DATOS DE CONTENIDO DE ÉSTERES METÁLICOS DE ÁCIDO GRASO EN MUESTRA DE BIODIESEL, SEGÚN NORMA INTERNACIONAL**

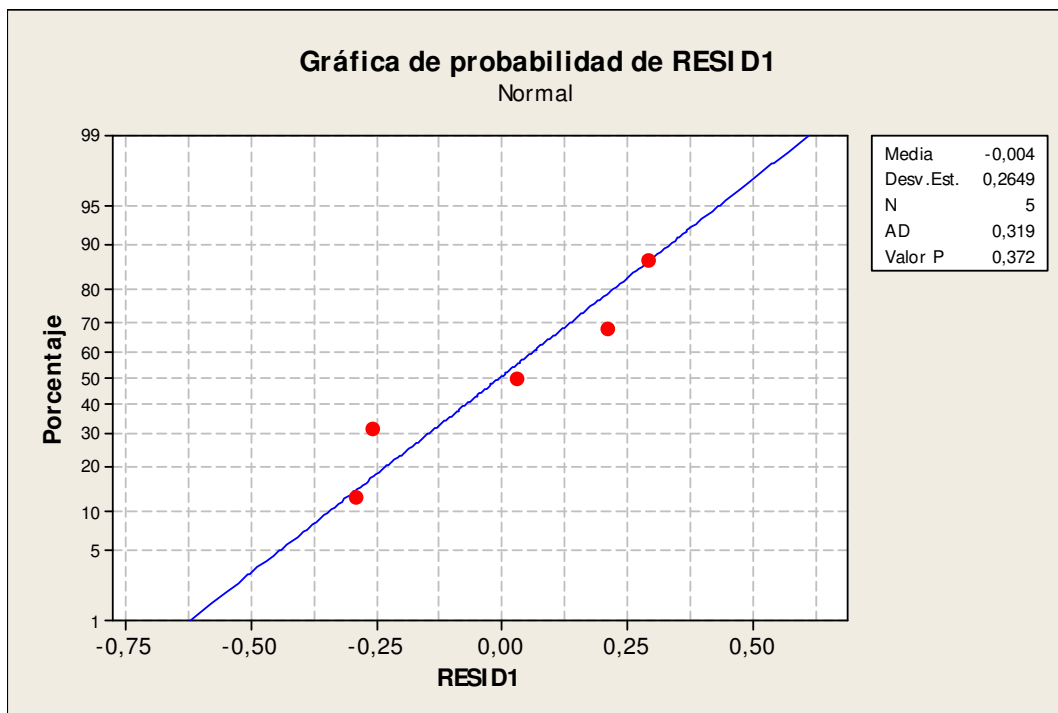
Medición	Contenido de Ésteres Metólicos Totales (%)
1	75,29
2	75,58
3	75,03
4	75,61
5	75,11
<b>Promedio</b>	<b>75,32</b>

Criterio:  $P_{\text{value}} > 0,05$

Resultado observado en MINITAB:  $P_{\text{value}} = 0,372$

$0,372 > 0,05$

Queda verificada la distribución normal de las residuales



### 7.2.2. Verificación del porcentaje de recuperación.

El porcentaje de recuperación se evalúa de la siguiente forma:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Concentración Calculada}}{\text{Concentración Teórica}} \times 100$$

La concentración calculada es el promedio de todos los resultados obtenidos en la cuantificación de ésteres metílicos de ácido graso, según la tabla N° 23. La concentración teórica es el promedio de todos los resultados obtenidos en la cuantificación de ésteres metílicos de ácido graso, según la norma internacional. Tabla N° 24. De lo mencionado anteriormente se tiene:

Concentración calculada: **74,74 %**

Concentración teórica: **75,32 %**

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Concentración Calculada}}{\text{Concentración Teórica}} \times 100 = \frac{74,74}{75,32} \times 100 = 99,23 \%$$

El porcentaje de recuperación es **99,23%**

### 7.3. EVALUACIÓN DE LA PRECISIÓN.

Para la evaluación de la precisión se realizaron las siguientes pruebas:

#### 7.3.1. Verificación de comportamiento normal de residuales.

Se evalúa mediante el Test de Anderson – Darling. Para ello se tienen los datos presentes en la siguiente tabla:

**TABLA N°26 DATOS DE CONTENIDO DE ÉSTERES METÍLICOS DE ÁCIDO GRASO EN MUESTRA DE BIODIESEL**

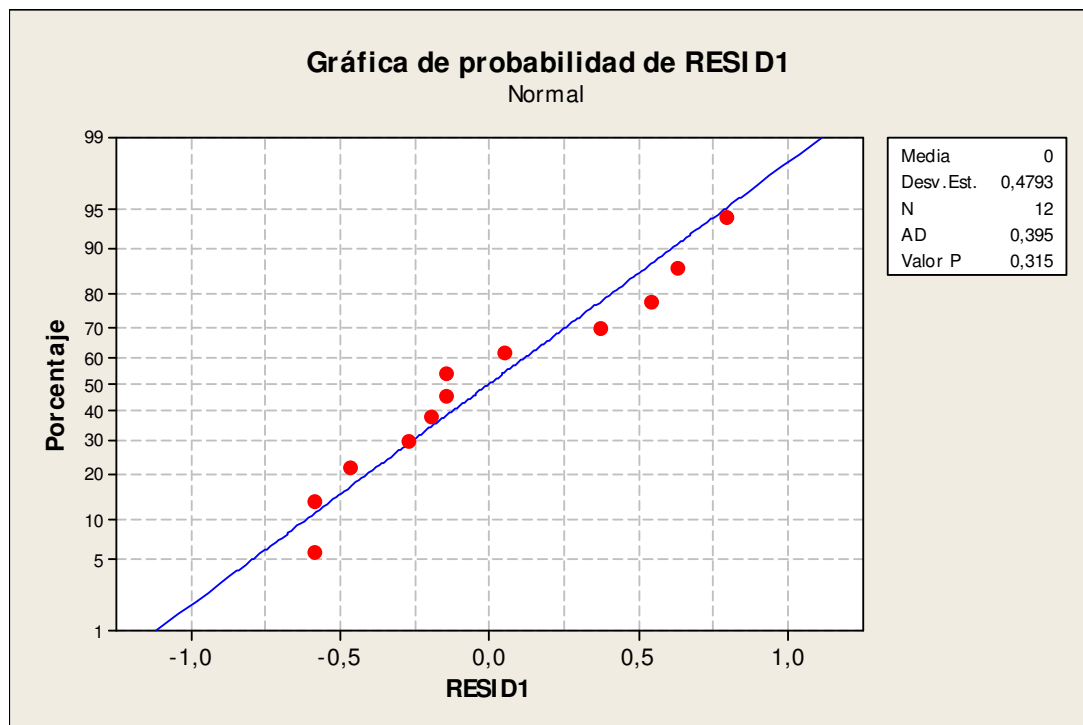
Medición	Contenido de Ésteres Metílicos Totales (%)
1	74,47
2	75,11
3	74,86
4	75,43
5	75,69
6	74,79
7	75,22
8	73,84
9	73,96
10	74,28
11	74,97
12	74,28
<b>Promedio</b>	<b>74,74</b>

Criterio:  $P_{\text{value}} > 0,05$

Resultado observado en MINITAB:  $P_{\text{value}} = 0,315$

$0,315 > 0,05$

Queda verificada la distribución normal de las residuales



### 7.3.2. Verificación de igualdad de varianzas.

Se evalúa mediante el test de Bartlett's., para comparar varianzas. Para ello se tienen los datos presentes en la siguiente tabla:

Analista	Contenido de Ésteres Metílicos Totales (%)
1	74,47
1	75,11
1	74,86
1	75,43
1	75,69
1	74,79
2	75,22
2	73,84
2	73,96
2	74,28
2	74,97
2	74,28

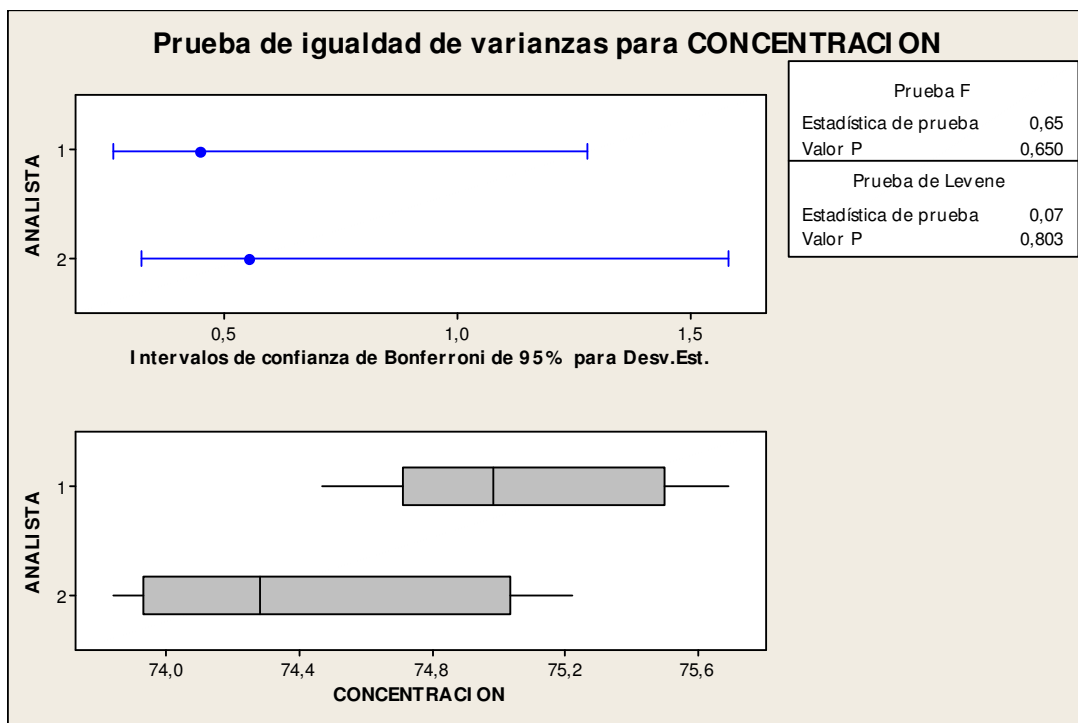
Criterio:  $P_{\text{value}} > 0,05$

Resultado observado en MINITAB:  $P_{\text{value}} = 0,650$

$0,650 > 0,05$

Queda verificado que la variabilidad no es significativa, es decir queda demostrada la precisión entre analistas, ver el grafico siguiente:





### 7.3.3. Coeficiente de Variación.

Se evalúa aplicando la siguiente fórmula:

$$\% C.V. = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

Donde:

C.V.: Coeficiente de variación.

S: Desviación estándar muestral. (n-1).

$\bar{x}$ : Media aritmética.

De los datos de la tabla No 23. Aplicamos en la fórmula:

$$\% C.V. = \frac{s}{x} \times 100 = \frac{0,582328138}{74,74} \times 100 = 0,78$$

El coeficiente de variación máximo, según la AOAC, para concentraciones en rango de %, es de 11,00 % (Dato obtenido de AOAC Peer Verified method Program, Manual on Polices and Procedures, Arglinton, Virginia, USA, Nov, 1993).

#### 7.3.4. Verificación de la repetibilidad, según la norma EN 14103.

Según la norma EN 14103, la repetibilidad se evalúa para dos resultados, utilizando el mismo método, para cuantificar la misma muestra, en el mismo laboratorio por el mismo analista utilizando el mismo cromatógrafo. La diferencia absoluta entre estos dos resultados no debe ser mayor a:

<b>Para contenido de ésteres</b>	1,6 % (W/W)
<b>Para contenido de éster metílico de Ácido Linolénico</b>	0,1 % (W/W)

Para los dos analistas, se obtuvieron los siguientes resultados de contenido de ésteres metílicos de ácido graso expresado en porcentaje (W/W)

<b>Analista No. 1</b>	<b>Analista No. 2</b>
<b>74,47</b>	<b>75,22</b>
75,11	<b>73,84</b>
74,86	73,96
75,43	74,28
<b>75,69</b>	74,97
74,79	74,28

Para poder evaluar la repetibilidad, tomaremos el mayor valor obtenido y el menor valor obtenido, por cada uno de los analistas según la tabla anterior.

Para el Analista No. 1

$$75,69 - 74,47 = 1,22$$

Para el Analista No. 2

$$75,22 - 73,84 = 1,38$$

Según lo observado, queda verificada la repetibilidad de la cuantificación propuesta, según lo establecido por la norma EN 14103.

## 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Para el análisis semicuantitativo de los ésteres metílicos de ácido graso del aceite de palma, presentes en el biodiesel, se procedió a su evaluación de precisión en base a la concentración actual de cada éster metílico de ácido graso detectado. Esto se realizó al comparar el área obtenida con el estándar de 37 ésteres metílicos de ácido graso, respecto de las áreas de los ésteres metílicos de ácido graso detectado en la muestra. Así mismo, el factor de respuesta determinado para cada éster metílico, fue empleado con los valores de área de la muestra para identificar la masa de cada éster metílico de ácido graso presente en la muestra. Para determinar el porcentaje se aplica el peso de muestra registrado en la balanza analítica. .

Para la semicuantificación propuesta se verificaron los principales parámetros de validación, cuyos datos fueron sometidos a un análisis estadístico de acuerdo a los requerimientos normativos por las ISO 17025, ISO 5725-2.

- ✓ Un primer nivel de evaluación, estuvo dirigido a la revisión de la veracidad de los resultados obtenidos, según la semicuantificación del contenido de ésteres metílicos de ácido graso propuesta. Para ello se realizaron repeticiones de cuantificaciones según la norma EN-14103, en una muestra de referencia. Todo esto con la finalidad de determinar la concentración verdadera en dicha muestra y poder comparar con los resultados obtenidos según la semicuantificación propuesta. Inicialmente, se determinó y verificó que el comportamiento de los residuales de las mediciones obedece a una distribución normal; es decir cumple un comportamiento Gaussiano. La distribución de la variable que interesa ser comparada, también es importante para establecer la prueba estadística que nos permite evaluar la hipótesis nula de igualdad, tal que si la distribución es normal,

se utilizará los denominados test paramétricos y si no cumple dichos criterios se tiene la opción de usar los llamados test no paramétricos o de distribución libre, que se basan en los rangos de distribución de la variable. Todo lo anterior fue determinado con el test de Anderson – Darling; el cual se evaluó con el programa estadístico MINITAB. Al contrastar el  $P_{\text{Value}}$  obtenido de **0,920** con el nivel de confianza 95% ( $P_{\text{Value}}=0,05$ ), se observa un valor mayor; por lo que los resultados se distribuyen normalmente y es posible realizar pruebas estadísticas inferenciales. Finalmente, el cálculo de porcentaje de recuperación para el material de referencia dio como resultado **99.23%**. Este valor es considerado óptimo, dado que dentro de los criterios de aceptación, según normas ISO 17025, este debe oscilar entre 80 y 100%.

- ✓ En una siguiente etapa se verificó la repetibilidad de la semicuantificación propuesta con los datos obtenidos al determinar el contenido de ésteres metílicos de ácido graso contenido en la muestra de referencia. La media general es **74,74 % (W/W)** y su desviación estándar general es **0,4793 %**. Así mismo, se determinó y verificó que el comportamiento de los residuales de las mediciones obedece a una distribución normal. Al igual que con la exactitud, el  $P_{\text{Value}}$  de **0,315** fue obtenido con la prueba Anderson-Darling; el cual al ser contrastado con el nivel de confianza 95% ( $P_{\text{Value}}=0,05$ ) tiene un valor mayor confirmando que los resultados se distribuyen normalmente y es posible realizar pruebas estadísticas inferenciales. Luego se realizó el cálculo de la prueba de Bartlett's, que es de suma importancia para poder realizar pruebas de precisión entre dos analistas. Se obtuvo un valor de **0,650**, el cual al ser comparado para el nivel de confianza de 95% ( $P_{\text{Value}}=0.05$ ), corresponde a un valor mayor; el cual nos

indica que los analistas muestran igual precisión al realizar la semicuantificación del contenido de ésteres metílicos de ácido graso en biodiesel.

- ✓ El coeficiente de variación fue calculado en base a la desviación estándar de los datos obtenidos, dando un valor de **0,78%**. La comparación con lo normado por la AOAC, la que asigna como valor máximo un coeficiente de variación de **11.00%**, nos indica que el valor experimental obtenido está muy por debajo del valor referencial.

## **9. CONCLUSIONES.**

1. La semicuantificación propuesta nos reporta resultados comparables a los obtenidos cuando se aplica la norma EN-14103. A diferencia de ésta, la semicuantificación puede ser aplicada al control de las diferentes etapas del proceso de transesterificación, durante la producción de biodiesel.
2. La semicuantificación sugerida cumple, en sus diferentes niveles de estudio, con las pruebas de normalidad de residuales y la verificación de la diferencia no significativa de sus varianzas. Su evaluación fue realizada aplicando el programa estadístico MINITAB y los resultados obtenidos confirman la veracidad de la semicuantificación.
3. Los resultados de la semicuantificación fueron satisfactorios, dado que el trabajo experimental realizado resulta ser apropiado, para la evaluación del proceso de transesterificación durante la producción de biodiesel.

## 10. BIBLIOGRAFÍA.

(01) Sensoz, S., *et al.*, INFLUENCE OF PARTICLE SIZE ON THE PYROLYSIS OF RAPESEED (*Brassica napus* L.): FUEL PROPERTIES OF BIO-OIL, *Biomass Bioenergy*, 19, 271-279, 2000.

(02) Dowaki, K., *et al.*, AN ECONOMIC AND ENERGY ANALYSIS ON BIO-HYDROGEN FUEL USING A GASIFICATION PROCESS, *Renewable Energy*, 32, 80-94, 2007.

(03) Sheehan, J., Dunahay., A LOOK BACK AT THE U.S. DEPARTMENT OF ENERGY'S AQUATIC SPECIES PROGRAM – BIODIESEL FROM ALGAE; *National Renewable Energy Laboratory (NREL) Report*. NREL/TP-580-24190. Golden CO.

(04) Fernando, S., Hall, C., NO<sub>x</sub> REDUCTION FROM BIODIESEL FUELS; *Energy Fuels*, 20, 376 – 382, 2006.

(05) Demirbas, A., GLOBAL BIOFUEL STRATEGIES, *Energy Edu Sci Technol*, 17, 27 – 63, 2006

(06) Reijnders, L., CONDITIONS FOR THE SUSTAINABILITY OF BIOMASS BASED FUEL USE, *Energy Policy*, 34, 863 - 876, 2006.

(07) Puhan., *et al.*, MAHUA (*Madhuca indica*.) SEED OIL: A SOURCE OF RENEWABLE ENERGY IN INDIA, *J Sci. Ind. Res.*, 64, 890 - 896, 2005



(08) Meher., *et al.*, TECHNICAL ASPECTS OF BIODIESEL PRODUCTION BY TRASNESTERIFICATION *Renew Sustain Energy Rev.*,10, 248 - 268, 2006

(09) Nitschke, W.R., Wilson C.M., RUDOLPH DIESEL, PIONEER OF THE AGE OF POWER, *University of Oklahoma Press.*, 1965

(10) Demirbas, A., BIODIESEL FROM VEGETABLE OILS VIA TRANSESTERIFICATION IN SUPERCRITICAL METHANOL, *Covers Mgmt.*,43, 2349 - 56, 2002

(11) Graboski, M.S., McCormick, R.L., COMBUSTION OF FAT AND VEGETABLE OIL DERIVATED FUELS IN DIESEL ENGINES *Prog Energy Combust Sci.*,24, 125 - 164, 1998

(12) Bala, B.K., STUDIES OH BIODIESELS FROM TRANSFORMATION OF VEGATABLE OILS FOR DIESEL ENGINES AS RENEWABLE FUELS FOR DIESEL ENGINES, *Edu Sci Technol.*,15, 1 - 43, 2005

(13) Clark, S.J., Wagner, L., Schrock, M.D., Pinnaar, P.G., METHYL AND ETHYL ESTERS AS RENEWABLE FUELS FOR DIESEL ENGINES, *JAOCs.*,61, 1632 - 1638, 1984

(14) Mc Nair, Harold M., Miller, James., BASIC GAS CHROMATOGRAPHY, *John Wiley & Sons.*,1, 1 - 3, 2009

(15) Mc Nair, Harold M., Miller, James., BASIC GAS CHROMATOGRAPHY, *John Wiley & Sons.*,1, 3 - 4, 2009

(16) Rouessac, Francis., Rouessac, Annick., CHEMICAL ANALYSIS MODERN INSTRUMENTATION METHODS AND TECHNIQUES, *John Wiley & Sons.*,2, 31, 2007

(17) Rouessac, Francis., Rouessac, Annick., CHEMICAL ANALYSIS MODERN INSTRUMENTATION METHODS AND TECHNIQUES, *John Wiley & Sons.*,1, 24 - 27, 2007

(18) Jennings, Walter., Mittlefehldt, Eric., ANALYTICAL GAS CHROMATOGRAPHY, *Academic Press.*,1, 2 - 3, 1997

(19) Fowlis, Ian., GAS CHROMATOGRAPHY ANALYTICAL CHEMISTRY BY OPEN LEARNING, *John Wiley & Sons.*,3, 23 - 28, 1995

(20) Fowlis, Ian., GAS CHROMATOGRAPHY ANALYTICAL CHEMISTRY BY OPEN LEARNING, *John Wiley & Sons.*,4, 74 - 80, 1995

(21) Mc Nair, Harold M., Miller, James., BASIC GAS CHROMATOGRAPHY, *John Wiley & Sons.*,2, 14 - 28, 2009

(22) Rouessac, Francis., Rouessac, Annick., CHEMICAL ANALYSIS MODERN INSTRUMENTATION METHODS AND TECHNIQUES, *John Wiley & Sons.*,2, 33 - 34, 2007

(23) Rouessac, Francis., Rouessac, Annick., CHEMICAL ANALYSIS MODERN INSTRUMENTATION METHODS AND TECHNIQUES. *John Wiley & Sons.*,2, 39 - 40, 42 – 43, 2007

**(24)** Jennings, Walter., Mittlefehldt, Eric

ANALYTICAL GAS CHROMATOGRAPHY

*Academic Press.*,2, 30 - 46, 1997

**(25)** Root, Dean., THE TROUBLESHOOTING AND MAINTENANCE GUIDE  
FOR GAS CHROMATOGRAPHERS, *John Wiley & Sons.*,5, 53 - 72, 2007

**(26)** Mc Nair, Harold M., Miller, James., BASIC GAS CHROMATOGRAPHY,  
*John Wiley & Sons.*,6, 97 - 102, 2009

**(27)** Fowlis, Ian., GAS CHROMATOGRAPHY ANALYTICAL CHEMISTRY  
BY OPEN LEARNING, *John Wiley & Sons.*,6, 136 - 155, 1995

**(28)** Mc Nair, Harold M., Miller, James., BASIC GAS CHROMATOGRAPHY,  
*John Wiley & Sons.*,7, 108 - 114, 2009

**(29)** Rouessac, Francis., Rouessac, Annick., CHEMICAL ANALYSIS MODERN  
INSTRUMENTATION METHODS AND TECHNIQUES, *John Wiley & Sons.*,2, 46 -  
47, 2007

**(30)** Rouessac, Francis., Rouessac, Annick., CHEMICAL ANALYSIS MODERN  
INSTRUMENTATION METHODS AND TECHNIQUES, *John Wiley & Sons.*,2, 47 -  
48, 2007

**(31)** Mc Nair, Harold M., Miller, James., BASIC GAS CHROMATOGRAPHY,  
*John Wiley & Sons.*,8, 129 - 131, 2009

**(32)** Mc Nair, Harold M., Miller, James., BASIC GAS CHROMATOGRAPHY,  
*John Wiley & Sons.*,8, 138, 2009

(35) Rouessac, Francis., Rouessac, Annick., CHEMICAL ANALYSIS MODERN INSTRUMENTATION METHODS AND TECHNIQUES, *John Wiley & Sons.*,4, 105 - 106, 2007

(34) Rouessac, Francis., Rouessac, Annick., CHEMICAL ANALYSIS MODERN INSTRUMENTATION METHODS AND TECHNIQUES, *John Wiley & Sons.*,4, 107 - 108, 2007

(35) Araya Alpízar, Carlomagno., ESTADISTICA PARA LABORATORISTA QUÍMICO, *Editorial de la Universidad de Costa Rica.*,1, 6, 2004

(36) N. Miller, James., C. Miller, Jane., ESTADISTICA Y QUIMIOMETRIA PARA QUÍMICA ANALÍTICA, *Prentice Hall.*,7, 189 - 217, 2002

(37) Araya Alpízar, Carlomagno., ESTADISTICA PARA LABORATORISTA QUÍMICO, *Editorial de la Universidad de Costa Rica.*,1, 8, 2004

(38) Araya Alpízar, Carlomagno., ESTADISTICA PARA LABORATORISTA QUÍMICO, *Editorial de la Universidad de Costa Rica.*,2, 13, 2004

(39) Araya Alpízar, Carlomagno., ESTADISTICA PARA LABORATORISTA QUÍMICO, *Editorial de la Universidad de Costa Rica.*,2, 20 - 22, 2004

(40) Araya Alpízar, Carlomagno., ESTADISTICA PARA LABORATORISTA QUÍMICO, *Editorial de la Universidad de Costa Rica.*,2, 23, 2004

(41) N. Miller, James., C. Miller, Jane., ESTADISTICA Y QUIMIOMETRIA PARA QUÍMICA ANALÍTICA, *Prentice Hall.*,3, 43, 2002

## 11. ANEXOS.

### Certificate of Composition

DESCRIPTION: F.A.M.E. Mix C4-C24

CATALOG NO.: 18919-1AMP  
LOT NO.: LB-63416

MFG. DATE: Dec 2008  
EXP. DATE: Dec 2011

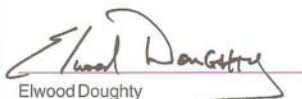
ANALYTE	CAS NO.	PURITY (1)	WEIGHT% (2)	SUPELCO LOT NO.
MYRISTOLEIC ACID METHYL ESTER	56219-06-8	99.9	1.98	LB46488
CIS-10-PENTADECENOIC ACID METH	90176-52-6	99.0 (a)	1.98	LB54615
LINOLELAIDIC ACID METHYL ESTER	2566-97-4	99.9	1.99	LB58166
GAMMA-LINOLENIC ACID METHYL ES	16326-32-2	99.7	2.02	LB58472
METHYL CIS-5,8,11,14-EICOSATET	2566-89-4	99.3	1.99	LB60304
CIS-4,7,10,13,16,19-DOCOSAHEXA	301-01-9	99.7	1.98	LB52030
METHYL CIS-5,8,11,14,17-EICOSA	2734-47-6	99.9	2.00	LB63393
METHYL BUTYRATE	623-42-7	99.9	4.01	LB44732
METHYL HEXANOATE	106-70-7	99.7	3.99	LB30459
METHYL OCTANOATE	111-11-5	99.9	3.99	LB57883
METHYL DECANOATE (CAPRATE)	110-42-9	99.9	4.03	LB55928
METHYL UNDECANOATE	1731-86-8	99.5	1.99	LB29061
METHYL LAURATE	111-82-0	99.8	4.07	LB32645
METHYL TRIDECANOATE	1731-88-0	99.4	1.99	LB56329
METHYL MYRISTATE	124-10-7	99.7	3.99	LB59517
METHYL PENTADECANOATE	7132-64-1	99.6	2.00	LB53149
METHYL PALMITATE	112-39-0	99.9	5.94	LB61583
METHYL HEPTADECANOATE	1731-92-6	99.9	2.01	LB54611
METHYL STEARATE	112-61-8	99.9	3.96	LB55918
METHYL HENEICOSANOATE	6064-90-0	99.9	1.98	LB53233
METHYL BEHENATE	929-77-1	99.8	3.97	LB60315
METHYL TRICOSANOATE	2433-97-8	99.9	1.98	LB54832
METHYL PALMITOLEATE (METHYL CI	1120-25-8	99.7	2.00	LB56664
CIS-9-OLEIC METHYL ESTER	112-62-9	99.9	3.98	LB59549
METHYL LINOLEATE	112-63-0	99.9	2.03	LB57489
METHYL ERUCATE (CIS-13-DOCOSEN	1120-34-9	99.5	1.99	LB38600
METHYL NERVONATE	2733-88-2	99.9	2.04	LB51318
METHYL ARACHIDATE	1120-28-1	99.9	3.97	LB53222
METHYL LIGNOCERATE	2442-49-1	99.8	3.98	LB62549

(1) Determined by GC-FID unless otherwise noted.

(a) Resale Item.

(2) Weight percent of analyte, calculated by using analyte weights. The total may not equal 100% due to rounding. Weight concentrations may not remain stable after opening, even if resealed.

NIST-Traceable weights are used to verify balance calibration with the preparation of each lot.

  
Elwood Doughty  
QA Manager

Supelco warrants that its products conform to the information contained in this publication. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. Please see the latest catalog or order invoice and packing slip for additional terms and conditions of sale.

  
595 North Harrison Road • Bellefonte, PA  
16823-0048 USA • Phone (814) 359-3441

# Certificate of Composition

DESCRIPTION: F.A.M.E. Mix C4-C24

CATALOG NO.: 18919-1AMP

MFG. DATE: Dec 2008

LOT NO.: LB-63416

EXP. DATE: Dec 2011

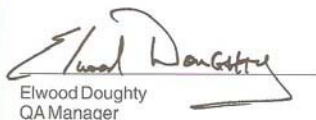
ANALYTE	CAS NO.	PURITY (1)	WEIGHT% (2)	SUPELCO LOT NO.
TRANS-9-ELAIDIC METHYL ESTER	2462-84-2	96.9	2.06	LB38597
METHYL LINOLENATE	301-00-8	99.6	2.03	LB60101
METHYL EICOSENOATE	2390-09-2	99.9	2.06	LB58778
CIS-10-HEPTADECENOIC ACID METH	75190-82-8	99.9	2.02	LB62388
CIS-11,14-EICOSADIENOIC ACID M	2463-02-7	99.9	1.99	LB58061
CIS-11,14,17-EICOSATRIENOIC AC	55682-88-7	97.8	2.06	LB54318
CIS-8,11,14-EICOSATRIENOIC ACI	21061-10-9	99.9	2.00	LB57699
CIS-13,16-DOCOSADIENOIC ACID M	61012-47-3	99.6	1.98	LB56325

(1) Determined by GC-FID unless otherwise noted.

(a) Resale Item.

(2) Weight percent of analyte, calculated by using analyte weights. The total may not equal 100% due to rounding. Weight concentrations may not remain stable after opening, even if resealed.

NIST-Traceable weights are used to verify balance calibration with the preparation of each lot.

  
Elwood Doughty  
QA Manager

Supelco warrants that its products conform to the information contained in this publication. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. Please see the latest catalog or order invoice and packing slip for additional terms and conditions of sale.

  
595 North Harrison Road • Bellefonte, PA  
16823-0048 USA • Phone (814) 359-3441



110 Benner Circle  
Bellefonte, PA 16823-8812  
Tel: (800)356-1688  
Fax: (814)353-1309

FOR LABORATORY USE ONLY—READ MSDS PRIOR TO USE

## Certificate of Analysis

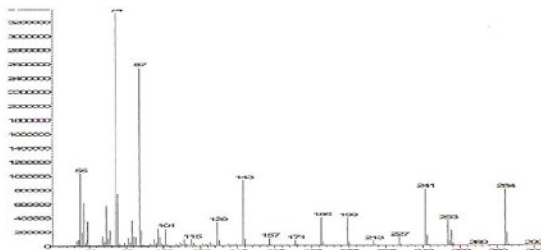
Catalog No.: 35050

Lot No.: N-17M-A15-T

Description: Methyl Heptadecanoate

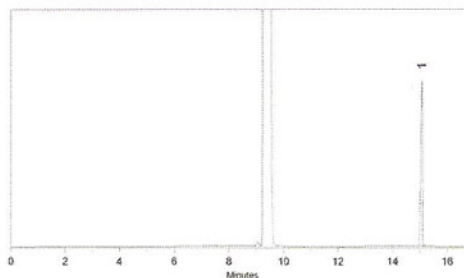
Package Size: 100mg  
IUPAC Name: Methyl  
Heptadecanoate  
Carbon No.: C17:0  
CAS No.: [1731-92-6]  
Molecular Formula:  $C_{18}H_{36}O_2$   
Molecular Weight: 284.48  
Melting Point: 30°C  
Boiling Point: 185°C @ 9 Torr  
152°C @ 0.05 Torr

### El Mass Spectrum



Purity by GLC/FID: 99.9%

Column: 100m x .25mm x 0.2um  
RT-2560 (Cat.#13199)  
Carrier Gas: hydrogen @ 40 cm/sec.  
Temp. Program: 100°C to 240°C  
@ 20°C (hold 10 min.)  
Inj. Temp: 200°C  
Det Temp: 250°C  
Det. Type: FID



*Sara Eyster*

Sara Eyster—QA Analyst



Manufactured under Restek's ISO  
9001 Registered Quality System  
Certificate #FMB0397

English version

**Fat and oil derivatives - Fatty Acid Methyl Esters (FAME) -  
Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents**

Produits dérivés des corps gras - Esters méthyliques  
d'acides gras (EMAG) - Détermination de la teneur en ester  
et en ester méthylique de l'acide linoléique

This draft European Standard is submitted to CEN members for enquiry. It has been drawn up by the Technical Committee CEN/TC 307.

If this draft becomes a European Standard, CEN members are bound to comply with the CEN/CENELEC Internal Regulations which stipulate the conditions for giving this European Standard the status of a national standard without any alteration.

This draft European Standard was established by CEN in three official versions (English, French, German). A version in any other language made by translation under the responsibility of a CEN member into its own language and notified to the Management Centre has the same status as the official versions.

CEN members are the national standards bodies of Austria, Belgium, Czech Republic, Denmark, Finland, France, Germany, Greece, Iceland, Ireland, Italy, Luxembourg, Netherlands, Norway, Portugal, Spain, Sweden, Switzerland and United Kingdom.

**Warning:** This document is not a European Standard. It is distributed for review and comments. It is subject to change without notice and shall not be referred to as a European Standard.



EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION  
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION  
EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG

Management Centre: rue de Stassart, 36 B-1050 Brussels

© 2001 CEN All rights of exploitation in any form and by any means reserved  
worldwide for CEN national Members.

Ref. No. prEN 14103:2001 E

COPYRIGHT European Committee for Standardization

Licensed by Information Handling Services



## Foreword

This document has been prepared by CEN /TC 307, "Oilseeds, vegetable and animal fats and oils and their by products - Methods of sampling and analysis".

This document is currently submitted to the CEN Enquiry.

This document has been prepared under a mandate given to CEN by the European Commission and the European Free Trade Association, and supports essential requirements of EU Directive(s).

For relationship with EU Directive(s), see informative annex Z, which is an integral part of this document.

## 1 Scope

The purpose of this document is to determine the ester content of fatty acid methyl esters intended for incorporation into diesel oil. It also allows to determine the linolenic acid methyl ester content.

It allows one to verify that the ester content of vegetable oil methyl esters is greater than 96,5 % by mass (*M/M*).

This method is suitable for FAME which contain methyl esters between  $C_{14}$  and  $C_{24}$ .

## 2 Normative references

This European Standard incorporates by dated or undated reference, provisions from other publications. These normative references are cited at the appropriate places in the text and the publications are listed hereafter. For dated references, subsequent amendments to or revisions of any of these publications apply to this European Standard only when incorporated in it by amendment or revision. For undated references the latest edition of the publication referred to applies.

EN ISO 5508, *Animal and vegetable fats and oils - Analysis by gas chromatography of methyl esters of fatty acids*.

## 3 Principle

Determination of the percentage of methyl esters of fatty acids present in the sample by gas chromatography according to EN ISO 5508 with internal calibration (methyl heptadecanoate).

Determination of the percentage of linolenic acid methyl ester present in the sample by gas chromatography according to EN ISO 5508.

## 4 Glassware

4.1 Screw-cap vials with PTFE-faced septa, 10 ml capacity.

4.2 Volumetric flask, 50 ml capacity.

4.3 Pipette, of 5 ml capacity.

## 5 Reagents

5.1 Heptane of analytical grade.

5.2 Methyl heptadecanoate of known purity (99 % minimum).

5.3 10 mg/ml methyl heptadecanoate solution : accurately weigh approximately 500 mg of methyl heptadecanoate (5.2) in a 50 ml volumetric flask (4.2) and make up to mark with heptane (5.1).

## 6 Apparatus

Usual laboratory apparatus and, in particular, the apparatus described in EN ISO 5508.

## 7 Preparation of the sample

Accurately weigh approximately 250 mg of sample in a 10 ml vial (4.1), then add 5 ml of methyl heptadecanoate solution (5.3) using a graduated pipette (4.3).

## 8 Chromatographic analysis

Refer to EN ISO 5508 and to Annex A which described, by way of indication, analysis conditions which may be used.

The chromatographic conditions (injected quantity, oven temperature, carrier gas pressure and split flow rate) shall be adjusted so as to correctly visualize the methyl ester peaks of the lignoceric ( $C_{24}$ ) and nervonic ( $C_{24:1}$ ) acids.

The integration shall be carried out as from the methyl myristate ( $C_{14}$ ) peak up to that of the methyl ester in  $C_{24:1}$  taking all the peaks into consideration, including the minor ones.

NOTE If some unknown peaks are found (others than saturated and mono-unsaturated FAME) between the linolenic acid ( $C_{18:3}$ ) and the nervonic acid ( $C_{24:1}$ ), presence of fish oil in the sample can be suspected.

## 9 Expression of results

### 9.1 Determination of ester content

The ester  $C$  content, expressed in percentage ( $M/M$ ), is calculated using the following formula :

$$C = \frac{(\sum A) - A_{EI}}{A_{EI}} \times \frac{C_{EI} \times V_{EI}}{W} \times 100$$

where

- $\sum A$  is the total peak area from the methyl ester in  $C_{14}$  to that in  $C_{24:1}$  ;
- $A_{EI}$  is the peak area corresponding to methyl heptadecanoate ;
- $C_{EI}$  is the concentration, in milligrams per millilitre, of the methyl heptadecanoate solution (5.3) being used ;
- $V_{EI}$  is the volume, in millilitres, of the methyl heptadecanoate solution (5.3) being used ;
- $W$  is the weight, in milligrams, of the sample.

NOTE 1 In the case of vegetable oils, the result of the calculation based on relative areas is considered to represent a percentage by mass.

NOTE 2 If the average of two determinations is higher than 100,8 % than discard the results and verify the experimental conditions as well as the purity of internal standard by using this method to determine the ester content of a commercial or prepared mixture.

Express the result to one decimal place.

## 9.2 Determination of linolenic acid methyl ester

The linolenic acid methyl ester content  $L$ , expressed in percentage (M/M), is calculated using the following formula :

$$L = \frac{A_L}{\left(\sum A_i\right) - A_{EI}} \times 100$$

where

$\sum A_i$  is the total peak area from the methyl ester in  $C_{14}$  to that in  $C_{24:1}$  ;

$A_{EI}$  is the peak area corresponding to methyl heptadecanoate ;

$A_L$  is the peak area corresponding to methyl heptadecanoate.

Express the result to one decimal place.

## 10 Precision

An interlaboratory test organized in 2000 at European level with the participation of eleven laboratories, each having carried out two determinations on each sample, gave the statistical results indicated in annex B.

### 10.1 Repeatability

The absolute difference between two independent single test results, obtained using the same method on identical test material in the same laboratory by the same operator using the same equipment within a short time interval, shall not be greater than :

For ester content	1,6 % (M/M)
For linolenic acid methyl ester content	0,1 % (M/M)

more than once out of 20.

### 10.2 Reproducibility

The absolute difference between two single test results, obtained using the same method on identical test material in different laboratories by different operators using different equipment, shall not be greater than :

For ester content	3,1 % (M/M)
For linolenic acid methyl ester content (L)	$0,311 \times L + 0,02$ % (M/M)

more than once out of 20.

## 11 Test report

The test report shall specify :

- all information necessary for the complete identification of the sample ;
- the sampling method used if known ;
- the test method used, with reference to this European standard ;
- all operating details not specified in this European Standard, or regarded as optional, together with details of any incidents which may have influenced the test result(s) ;
- the test result(s) obtained, or if the repeatability has been checked, the final quoted result obtained.